

**DIE STOFFWECHSELKINETIK
VON D (-) MILCHSÄURE
BEI WIEDERKÄUERN**

Manfred Stangassinger

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555616_0034

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. Giesecke

D I E S T O F F W E C H S E L K I N E T I K

V O N D (-) M I L C H S Ä U R E

B E I W I E D E R K Ä U E R N

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Manfred Stangassinger
aus München

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. D. Giesecke
Korreferent: Prof. Dr. G. Dirksen

Tag der Promotion: 25. Februar 1977



INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1.	D-Milchsäure - ein Produkt physiologischer und pathologischer Fermentationsprozesse beim Wiederkäuer	2
1.2.	D-Milchsäure im intermediären Stoffwechsel	9
1.3.	Problemstellung	12
2.	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1.	Versuchstiere, Haltung und Fütterung	17
2.2.	Operative Vorbereitung von Versuchstieren	18
2.3.	Durchführung der Infusionsversuche	19
2.4.	Probengewinnung	20
2.4.1.	Blutproben	20
2.4.2.	Harnproben	21
2.4.3.	Organgewebeproben	21
2.5.	Technik der ^{14}C -Stoffwechselfmessungen	22
2.5.1.	Exhalationsmessung an Ziegen	22
2.5.2.	Stoffwechselfmessung an Gewebeschnitten	22
2.6.	Analytische und präparative Methoden	23
2.6.1.	Enzymatische Bestimmung der Milchsäure-Isomeren	23
2.6.2.	Enzymatische Bestimmung der Blutglucose	24
2.6.3.	Präparative Trennung der Milchsäure-Isomeren	24
2.6.4.	Isolierung der Blutglucose zur Bestimmung der spezifischen Aktivität	25
2.6.5.	Aufbereitung von ^{14}C -markierten Proben im Sample Oxidizer	26

2.7.	Radiometrische Messungen	26
2.7.1.	Exhalationsradiometrie	26
2.7.2.	^{14}C -Aktivitätsmessung im Flüssigszintillationszähler	28
2.8.	Kinetische Parameter des D-Milchsäurestoffwechsels sowie deren Berechnung	29
2.9.	Statistische Methoden	33
3.	ERGEBNISSE	34
3.1.	Kinetik der Konzentrationsabläufe von D-Milchsäure im Blut von Ziege, Schaf und Rind	34
3.1.1.	Normalspiegel von Milchsäure-Isomeren	34
3.1.2.	Dynamik der D-Milchsäure-Konzentration im Blut nach intravenöser Applikation	35
3.1.2.1.	Konzentrationsverlauf nach Kurzzeitinfusion	37
3.1.2.2.	Konzentrationsverlauf bei Dauerinfusion	41
3.2	D-Milchsäure-Verteilung	44
3.2.1.	Verteilungsbedingte Einflüsse auf den Konzentrationsverlauf von D-Milchsäure im Blut	44
3.2.2.	Verteilungsquotient, Verteilungsvolumen und Distributionskoeffizient von D-Milchsäure	45
3.3	Kinetik der Elimination von D-Milchsäure	48
3.3.1.	Berechnung aus dem Konzentrationsverlauf nach Kurzzeit- bzw. Dauerinfusion	48
3.3.2.	Eliminationskinetik im künstlichen Fließgleichgewicht	54
3.4.	Mechanismen der Elimination von D-Milchsäure	58
3.4.1.	Ausscheidung von D-Milchsäure im Harn	59
3.4.2.	Oxidation von D-Milchsäure zu CO_2	63
3.4.2.1.	$^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei Ziegen	63
3.4.2.2.	Oxidation von D-Milchsäure zu CO_2 in Gewebeschnitten in vitro	68
3.4.3.	Gluconeogenese aus D-Milchsäure	70

4.	DISKUSSION	78
4.1.	Kinetisches Verhalten von D-Milchsäure	78
4.2.	Metabolisierung von D-Milchsäure	82
4.3.	Ausscheidung von D-Milchsäure	84
4.4	Allgemeine Folgerungen	86
5.	ZUSAMMENFASSUNG	89
	SUMMARY	91
6.	LITERATURVERZEICHNIS	93

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Milchsäure ist seit rund 200 Jahren bekannt. Ihrer Isolierung aus Sauermilch (SCHEELE, 1780) und Muskulatur (BERZELIUS, 1807) folgte vor rund 100 Jahren der Existenzbeweis von 2 isomeren Formen (WISLICENUS, 1873). Heute kennen wir Milchsäure als chirale Verbindung mit 2 Enantiomeren, die als D(-)- und L(+)- bzw. entsprechend dem (R)-(S)-System als (R)- und (S)-Milchsäure bezeichnet werden (HOLTEN, 1971). Sogenannte racemische oder DL-Milchsäure kann beide Isomere in sehr wechselhaften Proportionen enthalten. Außerdem können in Abhängigkeit von der Konzentration durch intermolekulare Veresterungen auch verschiedenartige Polymere (zyklisches Dimer, lineare Polymere) auftreten (HOLTEN, 1971).

Seit den Arbeiten von MEYERHOF (1926) und CORI (1929) vor etwa 50 Jahren scheint kein Zweifel mehr zu bestehen, daß die physiologische Milchsäure des tierischen Organismus das L(+)Isomer ist. Das noch ungeklärte Problem von D(-)-Milchsäure als - sicherlich nebengeordnetes - Produkt des Threoninstoffwechsels (DAKIN u. DUDLEY, 1913; NEUBERG, 1913; ELLIOT, 1959; DAGLEY u. NICHOLSON, 1970) und die Ausscheidung kleiner D-Milchsäure-Mengen im menschlichen Harn (JUDGE u. VAN EYS, 1962) sowie das ausschließliche Vorkommen des D-Isomers in den Spermien des pazifischen Octopus (MANN, 1975) sind wohl als Ausnahmen anzusehen. Als hauptsächliche Quelle von D-Milchsäure gelten mikrobielle Gärungsprozesse, mit deren Produkten sich allerdings auch Mensch und Tier auseinandersetzen müssen, etwa in Form von Sauermilcherzeugnissen, Sauerkraut oder Gärfutter. Erst in letzter Zeit haben neue enzymatische Methoden (GAWEHN u. BERGMAYER, 1971) eingehende Untersuchungen über die biologische Bedeutung dieses lange vernachlässigten Isomers ermöglicht. So erscheint es naheliegend, daß auch im Verdauungstrakt unserer Nutztiere, dort wo Mikro-

organismen tätig sind und größere Mengen Kohlenhydrate hingelangen können, D-Milchsäure gebildet wird. Enzymatische Studien (CAMMACK, 1968, 1969, 1970) lassen auch darauf schließen, daß die Auseinandersetzung verschiedener Tierarten mit D-Milchsäure erheblich sein mag.

Bei Wiederkäuern sind inzwischen besondere Situationen und schwere Stoffwechselerkrankungen offensichtlich geworden, die mit der Bildung von D-Milchsäure im Vormagen in Zusammenhang stehen (DUNLOP u. Mitarbeiter, 1964; DUNLOP u. HAMMOND, 1965; BRAIDE u. DUNLOP, 1969).

Einer quantitativen Untersuchung des intermediären Stoffwechsels von D-Milchsäure bei Wiederkäuern ist die vorliegende Arbeit gewidmet.

1.1. D-Milchsäure - ein Produkt physiologischer und pathologischer Fermentationsprozesse beim Wiederkäuer

Obwohl D-Milchsäure in beträchtlichen Mengen mit dem Futter aufgenommen werden kann, scheinen daraus keine schweren, metabolischen Störungen zu resultieren. Bei 1 - 16 % DL-Milchsäure in der Trockenmasse von Silage z. B. liegt die Tagesaufnahme von Kühen bei rund 500 - 1000 g Gesamtmilchsäure, teils aber auch darüber (ORTH u. KAUFMANN, 1961; SATTER u. ESDALE, 1967). Da der Anteil des D-Isomers dabei maximal 80 % erreichen kann (SCHAADT u. JOHNSON, 1969), könnte die Aufnahme von D-Milchsäure bis zu 1000 g pro Tag betragen. Etwa 30 Minuten nach Fütterung von Silage steigt die Gesamt-Milchsäure-Konzentration im Pansen von ca. 0.2 bis auf 20 mM/l (WALDO u. SCHULTZ, 1956), dem 20fachen der normalen Lactat-Konzentration im Blut.

Die Milchsäureproduktion aus Kohlenhydraten im Pansen selbst stellt offenbar das Hauptproblem für den Wiederkäuer dar. Sie ist quantitativ gesehen wenig bekannt und auch nur schwer kontrollierbar. Die Normalwerte liegen

zwar auch bei verschiedenartiger Fütterung im Mittel nur bei 0.20 - 0.45 mM/l (BRÜGGEMANN u. GIESECKE, 1968), aber schon PHILLIPSON (1952) hatte mit abwechselnder 2-Mahlzeiten-Fütterung von Maisflocken und Heu Milchsäure-Konzentrationen bis zu 72.5 mM/l erhalten. Ähnlich hohe Werte wurden auch bei Fütterung von halbgereinigten Diäten mit Schwefelmangel beobachtet (WHANGER u. MATRONE, 1966). Hier betrug die Konzentration ebenfalls 4 Stunden nach Fütterung 96.3 mM/l mit einem Anteil von D-Milchsäure über 90 %. Ebenso wie in den vorhergenannten Experimenten blieben die Milchsäure-Spiegel im Pansen auch hier über mehrere Stunden (8 - 12) erhöht.

Aus diesen Daten geht hervor, daß hohe D-Milchsäure-Konzentrationen im Pansen unter sehr verschiedenartigen Bedingungen auftreten können. Nach neueren Untersuchungen (BARTELMUS, 1975) ist die Produktion von D-Milchsäure sogar als physiologisch anzusehen. Sie erfolgt selbst nach kleineren Gaben von Zuckern innerhalb von 15 - 30 Minuten und beträgt dann meist 50 - 60 % der DL-Milchsäure. Dies ist jedoch kaum überraschend, da rund die Hälfte der im Pansen hauptsächlich vorhandenen Bakterienarten zur Milchsäure-Bildung befähigt ist (GIESECKE, 1973). Nach Untersuchungen über die Verteilung von L- und D-Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27 u. EC 1.1.2.4) bei verschiedenen Species der normalen Pansenflora (vgl. Tab. 1) überwiegt die Kapazität zur Bildung des L-Isomers bei weitem. Bakterienarten die ebenfalls zu den Milchsäure-Bildnern zählen (GIESECKE, 1973) sind: *Succinobacillus dextrinosolvens*, *Lachnospira multiparus*, *Selenomonas lactilytica*, *Lactobacillus bifidus*, *Eubacterium ruminantium*, *Cillobacterium cellulosolvens*, *Ruminococcus albus*. Ihr Lactat bildendes Enzym-Muster sowie die Art des vorwiegend gebildeten Isomers sind hier noch nicht näher untersucht. Abgesehen von *Sc. bovis*, *Lb. bifidus* und *Cb. cellulosolvens* mit nahezu homofermentativer Lactat-Bildung überwiegend in der L-Form (STETTER u. KANDLER, 1973; GIESECKE, 1973), tritt

Tabelle 1

Milchsäure bildende Mikroorganismen der normalen Pansenflora

Species ^{a)}	Aktivität von Lactat-Dehydrogenase in zellfreien Extrakten von Bakterien ^{b)}	
	L(+)LDH (NAD)	D(-)LDH (NAD-frei)
	Enzymaktivität (Einheiten x 10 ² /mg Protein)	
Butyrivibrio fibrisolvens	12.3	0.1
Selenomonas ruminantium	409	0.69
Bacteroides amylophilus	0.76	0
Bacteroides ruminicola	0.37	0.02
Bacteroides succinogenes	33.2	0.18
Streptococcus bovis	579	2.4
Ruminococcus flavefaciens	1.36	0

^{a)} nach GIESECKE (1973); ^{b)} nach JOYNER u. BALDWIN (1966)

Milchsäure bei den übrigen Species als Nebenprodukt auf. Es ist jedoch bekannt, daß auch die Milieubedingungen im Pansen einen starken Einfluß auf Art und Menge der Fermentationsprodukte haben. So erzeugt z. B. *Ruminococcus flavefaciens* bei CO_2 -Mangel, d. h. bei einem $\text{pH} < 6$ statt Succinat, Lactat, Acetat und Äthanol nur noch Lactat (HOPGOOD u. WALKER, 1967). Auch eine Hemmung der Methanproduktion kann nach PRINS (1976) zu erhöhter Milchsäure-Bildung im Pansen führen. Neben den genannten Bakterien bilden aber auch Protozoen wie *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*-, *Epidinium*- und *Polyplastron*-Species Milchsäure (HARMEYER, 1973), über deren Isomeren-Zusammensetzung allerdings nichts bekannt ist.

Soweit D-Milchsäure als Nebenprodukt im Pansen entsteht, kann sie offenbar rasch eliminiert werden. Jedenfalls sinken postprandiale Lactatspiegel schnell wieder ab (BRÜGGE-MANN u. GIESECKE, 1968). Der Turnover von D- und L-Milchsäure im Pansen bei einer DL-Milchsäure-Konzentration von 3 - 5 mM/l ist mit 3.2 - 5.4 und 2.9 - 4.8 $\text{mM/l} \cdot \text{h}^{-1}$ (OGIMOTO u. GIESECKE, 1974) recht gering, zeigt aber, daß das D-Isomer ebenso rasch abgebaut wird wie L-Milchsäure. Die in dieser "ökologischen Nische" des Lactat-Umsatzes lactilytisch aktiven Bakterien schließen *Megasphaera* (*Peptostreptococcus*) *elsdenii* (ELSDEN u. Mitarbeiter, 1956), *Selenomonas lactilytica* (HOBSON u. MANN, 1961) und *Veillonella alcalescens* (JOHNS, 1949, 1951) ein. Jedoch nur die erstgenannte Species scheint biochemisch in der Lage zu sein, D-Milchsäure rasch und vollständig zu beseitigen (OGIMOTO u. GIESECKE, 1974). Obgleich alle Propionat bilden, wird von *M. elsdenii* dazu der Acrylat-Weg beschritten, von den beiden anderen Species aber der Succinat-Weg (s. Abb. 1), der einen Carboxylierungsschritt voraussetzt. Dieser ist CO_2 -limitiert und kann im Pansen bei einer Acidität von $\text{pH} < 6$ kaum noch ablaufen (SCHWARTZ u. GILCHRIST, 1975).

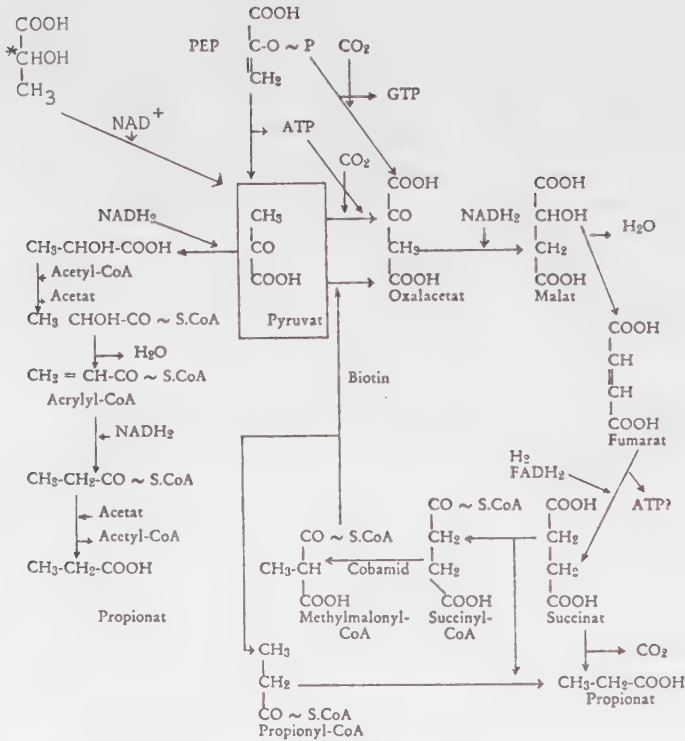


Abb. 1 Wege der Umsetzung von Lactat zu Propionat
(DEMEYER u. GIESECKE, 1973)

- Dicarboxylsäure ("Succinat") - Weg
z.B. *V. alcalescens*
- direkter Reduktions ("Acrylat") - Weg
z.B. *M. elsdenii*

Bei Überfütterung mit Stärke oder verschiedenen Zuckern erfolgt offenbar eine so rasche Erniedrigung des pH-Wertes im Pansen, daß sich lactilytische Bakterien insbesondere *M. elsdenii* nicht mehr ausreichend rasch vermehren können. Die Folge davon ist eine rasche Akkumulation von Milchsäure im Pansen (GIESECKE, BARTELMUS, STANGAS-SINGER, 1976). Außerdem tritt gleichzeitig auch eine durchgreifende Änderung der Pansenflora ein. Dabei gewinnen Bakterienspecies die Oberhand, die Milchsäure als Hauptfermentationsprodukt erzeugen. KROGH (1961, 1963), HUNGATE (1966), DUNLOP und HAMMOND (1965) sowie DIRKSEN (1970, 1973) haben diese Vorgänge eingehend gekennzeichnet. Eine Zusammenstellung der unter solchen Bedingungen dominierenden Bakterien zeigt Tabelle 2. Die Kapazität einzelner Species zur Erzeugung von Milchsäure-Isomeren ist entsprechend den gründlichen Studien von STETTER und KANDLER (1973) ergänzt. Wie sich zeigt, überwiegen gegenüber Normalbedingungen vor allem Species, die nicht nur Milchsäure als Hauptprodukt sondern in vergleichbar stärkerem Maße auch das D-Isomer, zum Teil sogar in reiner Form, bilden. Nach diesen Befunden dürften *L. brevis*, *L. bifidus* und *L. fermenti* neben *S. bovis* die dominierende Rolle bei einer DL-Milchsäure-Akkumulation im Pansen zuzuschreiben sein. Für die vermehrte Bildung von D-Isomer können nach STETTER und KANDLER (1973) 2 verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht werden: Eine relativ schwache D-Milchsäure-Bildung direkt aus Pyruvat über eine NAD-abhängige D(-)Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.28) mit geringer Aktivität, sowie eine starke D-Milchsäure-Bildung aus L-Milchsäure durch eine mikrobielle Lactat-racemase mit großer Aktivität. Hierbei handelt es sich um ein induzierbares Enzym, dessen Induktor L-Milchsäure ist (STETTER u. KANDLER, 1973). Eine vermehrte Bildung von D-Isomer unter den geschilderten mikrobiellen Veränderungen kann also auch eine unmittelbare Folge des Auftretens von L-Milchsäure sein.

Tabelle 2

Milchsäure bildende Bakterien im Pansen bei Überfütterung mit leicht verdaulichen Kohlenhydraten^{a)}

Species	Isomerenzusammensetzung der ^{b)} gebildeten Milchsäure (%)		Häufig- ^{c)} keit (%)
	D(-)	L(+)	
Lactobacillus acidophilus	9 - 37	91 - 63	nicht bekannt
L. bifidus	+	+	13.4 - 38.5
L. brevis	15 - 38	85 - 62	35.0 - 71.0
L. buchneri	+	+	3.4
L. casei	0 - 4	100 - 96	4.0
L. cellobiosus	55 - 57	45 - 43	1.3
L. delbrückii	100	0	4.3
L. fermenti	13 - 42	87 - 58	4.7 - 18.8
L. lactis	100	0	nicht bekannt
L. leichmannii	+	-	4.3
L. plantarum	48 - 61	52 - 39	1.3
Streptococcus bovis	+	+	30.4

a) nach KROGH (1961 u. 1963) und HUNGATE (1966)

b) nach STETTER und KANDLER (1973) bei früher - später Wachstumsphase

c) Anteil an der Gesamtzahl der gefundenen Lactobacillus spp. bzw. amylolytischer Streptococcus spp.
nach KROGH (1961 u. 1963)

+	= hauptsächlich	} gebildet
+	= in Spuren	
-	= nicht	

Das Isomeren-Verhältnis der Milchsäure im Pansen kann dabei unter den Bedingungen der Acidose nach älteren Arbeiten (C.S.I.R.O., 1949-59; DUNLOP u. HAMMOND, 1965) in recht weiten Grenzen schwanken, so z. B. von 30 % D : 70 % L bis 55 % D : 45 % L oder von 50 % D : 50 % L bis 85 % D : 15 % L. Neuere Untersuchungen mit enzymatischen Bestimmungsmethoden für D-Lactat zeigten, daß die Art des Futterwechsels die Proportionen der Isomeren ebenso wie den Zeitpunkt ihrer maximalen Konzentration im Pansen maßgeblich beeinflussen können (SLYTER u. Mitarbeiter, 1974). Bei pH-Werten < 5.5 wurde außerdem eine negative Beziehung des pH-Wertes zum Anteil von D-Milchsäure festgestellt (GIESECKE u. Mitarbeiter, 1976). Danach ergab sich bei pH 4.5 für die DL-Milchsäure des Pansens ein Anteil von rund 50 % D.

Die Resorption von Milchsäure aus dem Vormagen wurde nicht sehr eingehend untersucht. Jedenfalls scheint es sich um einen Diffusionsvorgang zu handeln, der bei Milchsäure Konzentrationen > 2 mM/l erst richtig einsetzt (GIESECKE, 1968) und wegen der abnehmenden Dissoziation mit fallendem pH-Wert rasch zunimmt (ANNISON, 1965; MACKENZIE, 1967). Versuche am ausgewaschenen Pansen deuten auf eine etwas raschere Resorption des D-Isomers hin (WILLIAMS u. MACKENZIE, 1965). Außerdem dürften größere Anteile der im Pansen gebildeten D-Milchsäure erst nach Abfluß in den Labmagen und Dünndarm resorbiert werden (HUETER u. Mitarbeiter, 1956; DOBSON, 1961; MACKENZIE, 1967).

1.2. D-Milchsäure im intermediären Stoffwechsel

Wie von den meisten Verdauungsprodukten liegen auch von D-Milchsäure kaum quantitative Angaben über den intermediären Stoffwechsel nach der Resorption vor. Größtenteils wurde ein diesbezüglicher Unterschied zwischen den beiden Isomeren auch wegen analytischer Probleme - zu geringe optische Drehung, notwendige Konzentrierung, dabei Polymerisation, Isomerisierung usw. (HOLTEN, 1971) - nicht

zur Kenntnis genommen. Als DUNLOP und Mitarbeiter (DUNLOP u. HAMMOND, 1965; BRAIDE u. DUNLOP, 1969) die "D-lactic acidosis" als eine besondere Form der metabolischen Acidose bei Rindern nach Überfütterung mit leicht vergärbaren Kohlenhydraten beschrieben, mußten sie sich noch einer Differenzbestimmung (aus Gesamt-Milchsäure und L-Lactat) bedienen, die auch unspezifische Reaktionen einschließt. Immerhin konnte gezeigt werden, daß bis zu 85 % der Milchsäure im Blut solcher Tiere auf das D-Isomer entfielen. Der Konzentrationsverlauf dieses Isomers im Blut normalisierte sich auffällig langsamer als bei L-Milchsäure und führte zu massiven Störungen der Homöostase.

Ältere aber widersprüchliche Untersuchungen über den Stoffwechsel von D-Milchsäure liegen von monogastrischen Säugern vor. Seit der Beobachtung, daß Methylglyoxal durch Glyoxalase (EC 3.1.2.6) zu D-Milchsäure umgesetzt wird, die ihrerseits bei Hunden mit Phlorizin-Diabetes Extraglucose lieferte (DAKIN u. DUDLEY, 1913), konnte eine physiologische Rolle des D-Isomers nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings zeigten MEYERHOF und LOHMANN (1926), daß die Leber nur aus L-Lactat Glykogen bildet. CORI und CORI (1929) bestätigten diesen Befund und stellten bei Ratten innerhalb von 3 Stunden nach Applikation von D-Milchsäure eine Ausscheidung von rund 30 % der Dosis im Harn fest - ein Ergebnis, das später zwar voll- auf bestätigt (MEDZIHRADSKY und LAMPRECHT, 1966), danach aber in Frage gestellt wurde (GIESECKE u. FABRITIUS, 1974).

Die Stoffwechselwege der D-Milchsäure konnten in vitro weitgehend aufgeklärt werden. Der Nachweis, daß Mitochondrien aus Leber und Niere nur D-Lactat zu Pyruvat oxidieren und zwar in Abwesenheit von Pyridin-Coenzymen (HUENNEKENS u. Mitarbeiter, 1951; MAHLER u. Mitarbeiter, 1953) fand durch Isolierung einer D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase (EC 1.1.99.6) aus Rattenleber und Kaninchen-

niere eine Erklärung (TUBBS u. GREVILLE, 1961; TUBBS, 1964). Dieses mitochondriale Flavinenzym mit schwacher Oxidase-Aktivität und bisher noch unbekanntem Akzeptor in vivo oxidiert in vitro auch D-Malat, D-Glycerat, meso-Tartrat sowie längerkettige D-2-Hydroxy-Säuren zu den entsprechenden Ketosäuren und scheint in den Organen größerer Tiere (Schwein, Schaf, Rind) geringere Aktivität aufzuweisen (CAMMACK, 1969; 1970). In Übereinstimmung hiermit setzten Leberschnitte von Schafen D-Milchsäure nur langsam oder überhaupt nicht um (HINKSON u. Mitarbeiter, 1967) und Gewebeschnitte des Pansens, Labmagens, Duodenums und Colons von Rindern vermochten aus ^{14}C -U-D-Lactat nur sehr wenig $^{14}\text{CO}_2$ zu bilden (PRESTON u. NOLLER, 1973). Andererseits ergaben neue Versuche in vivo (BARTELMUS, 1975), daß sich bei acidotischen D-Milchsäure-Konzentrationen im Pansen von rund 500 - 700 mg/100 ml keine D-Milchsäure im Blut oder Harn der Tiere nachweisen ließ, so daß eine weitgehende Metabolisierung angenommen werden mußte.

1.3. Problemstellung

Nach bisherigen Kenntnissen ist D-Milchsäure bei Wiederkäuern ein physiologisch normales aber unbedeutendes Zwischenprodukt der Pansenfermentation. Nur unter besonderen Bedingungen wird es als Hauptendprodukt akkumuliert und resorbiert. Beide Vorgänge schließen dabei besondere Probleme ein: Die Akkumulation im Pansen hat insbesondere Störungen der osmotischen Regulation zur Folge, deren klinische Konsequenzen eingehend beschrieben wurden (DUNLOP u. HAMMOND, 1965; DIRKSEN, 1965, 1970; HYLDGAARD, JENSEN u. SIMESSEN, 1966). Die Resorption von D-Milchsäure führt zu einer metabolischen Acidose mit den charakteristischen Folgeerscheinungen (DUNLOP u. HAMMOND, 1965; BRAIDE u. DUNLOP, 1968; DIRKSEN, 1965; MACKENZIE, 1967; TELLE u. PRESTON, 1971). Hinsichtlich des Schicksals von D-Milchsäure nach der Resorption liegen bisher keine quantitativ verwertbaren Kenntnisse vor. Zwar ist der enzymatische Mechanismus der Oxidation zu Pyruvat durch Versuche in vitro geklärt (CAMMACK, 1969, 1970). Aber schon der tierartige Vergleich der Enzymaktivitäten in bestimmten Organen führte zu falschen Schlüssen, weil die metabolische Körpergröße unberücksichtigt blieb. Tatsächlich ist die physiologische Rolle der D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase noch unbekannt.

Prinzipiell ist zu bedenken, daß auch jede enzymatische Einschnittreaktion letztlich ein quantitativer Vorgang ist, der in den intakten Organismus integriert werden muß. Vor allem tritt der metabolische Fluß von Stoffen durch das offene System eines Individuums als quantitativer Vorgang in Erscheinung, gleichgültig ob Nährstoffe in ihrer primären Form oder Verbindungen betrachtet werden, die erst während des Verdauungsprozesses oder im Intermediärstoffwechsel entstehen. Das gilt in vollem Umfange für D-Milchsäure im Stoffwechsel der Wiederkäuer, wenn sie aus dem Pansen resorbiert wird: Die quantitative Biochemie

ihrer Oxidation, Isomerisierung oder Transformation in höher geordnete Verbindungen und die Biokinetik ihrer Elimination aus dem Organismus bedurften einer grundlegenden Untersuchung. Diese hatte vor allem dem Umstand Rechnung zu tragen, daß, bedingt durch die jeweilige Konzentration im Vormagen, unterschiedliche Flüsse von D-Milchsäure in den Organismus eintreten und hier die verschiedenen Wege der Umwandlung und Elimination wechselhaft gestalten können.

Die Durchführung solcher Untersuchungen stellt besondere Anforderungen an die tierexperimentellen Methoden *in vivo*. Sie beruhen zum Teil auf einem bilanzartigen Vergleich der zugeführten und eliminierten Stoffmenge pro Zeiteinheit z. B. als arteriovenöse Differenz an einem isolierten Organ. Derartige Differenzmessungen dienten bisher relativ häufig zur Untersuchung des L-Lactat-Stoffwechsels *in vivo* an Einzelorganen wie z. B. der Leber des Menschen (WATERHOUSE u. KEILSON, 1966) und der Ratte (WOODS u. KREBS, 1971) sowie der Niere des Menschen (NIETH u. SCHOLLMAYER, 1966) und des Hundes (LEVY, 1962; LEAL-PINTO u. Mitarbeiter, 1973). Ein wesentlicher Nachteil solcher Verfahren liegt in der Beschränkung der Aussagen auf die Retention und Elimination des jeweiligen Stoffes.

Als erfolgversprechender werden demgegenüber stoffwechselkinetische Untersuchungen unter Anwendung von Tracer - Methoden gesehen. Sie gestatten es, mit minimalen Eingriffen am intakten und wachen Tier zu arbeiten. Der dynamische Gleichgewichtszustand der Metaboliten kann dabei voll berücksichtigt werden. Ist ein bestimmter Stoffwechsel-Weg bereits bekannt, so läßt sich mit entsprechenden radioaktiv markierten Verbindungen die Geschwindigkeit des Umsatzes ermitteln. Die mathematische Theorie biokinetischer Methoden *in vivo* wurde unter anderem von SOLOMON (1953), ROBERTSON (1957), SKINNER u. Mitarbeiter (1959), ZILVERSMIT (1960) und RESCIGNO u. SEGRE (1966) erarbeitet. Neuere Abhandlungen findet man bei SHIPLEY u. CLARK (1972)

und HARMEYER u. Mitarbeitern (1973).

Ein wesentlicher Vorteil kinetischer Stoffwechselstudien liegt in der Möglichkeit einer eindeutigen mathematischen Beschreibung der beteiligten Vorgänge. Derartige Ergebnisse liegen unter anderem von L-Milchsäure beim Menschen (KREISBERG u. Mitarbeiter, 1970), beim Hund (FORBATH u. Mitarbeiter, 1967), bei der Ratte (FREMINET u. Mitarbeiter, 1974) und beim Schaf (ANNISON u. Mitarbeiter, 1963) vor.

Grundsätzlich kann die Stoff- oder Aktivitätsmenge, deren Eliminierung (Metabolisierung, Exkretion usw.) aus dem Blut dargestellt werden soll, in Form einer Injektion (Kurzzeitinfusion) oder Dauerinfusion verabreicht werden. Nach einmaliger Gabe erfolgt vom Blut aus eine Verteilung auf alle in Frage kommenden Kompartimente, gegebenenfalls eine Verdünnung mit einem dort vorhandenen endogenen Pool und vom Zeitpunkt der Injektion an eine Metabolisierung bzw. Ausscheidung. Der erfaßbare Konzentrations- und Aktivitätsverlauf ist demnach die Resultante aus Verteilung, Metabolisierung und Exkretion. Bei kontinuierlicher Stoffzufuhr wird demgegenüber ein künstlicher Fließgleichgewichtszustand (steady state) "eingestellt", in dem die pro Zeiteinheit zugeführte Stoffmenge der eliminierten entspricht. Alle Verteilungsvorgänge zwischen Blut und allen anderen Kompartimenten befinden sich dann bereits im Gleichgewicht. Aus der konstanten Blutkonzentration (Plateau), der Infusionsrate und der Ausscheidung über den Harn lassen sich die Eliminations- und Metabolisierungsraten ermitteln.

Bisherige Untersuchungen z. B. zur Stoffwechselkinetik von L-Lactat (FORBATH u. Mitarbeiter, 1967; SEARLE u. CAVALIERI, 1972) oder Glucose (KRONFELD u. SIMESSEN, 1961; STEELE u. Mitarbeiter, 1966; WHITE u. Mitarbeiter, 1969; JUDSON u. LENG, 1972; LUICK u. Mitarbeiter, 1973) lassen keine eindeutige Überlegenheit des einen oder anderen Verfahrens er-

kennen. Während die Injektions-(Kurzzeitinfusions-)methode eine unmittelbare Beschreibung der Verteilungsvorgänge des Stoffes erlaubt, schließt sie bei der Darstellung der Eliminationskinetik den Nachteil sich ständig verändernder Konzentrationen und demzufolge auch Stoffumsetzungen ein, der dagegen bei Dauerinfusion vermieden wird. Weiterhin lassen sich bei Dauerinfusion aus Änderungen der spezifischen Aktivität mögliche endogene Quellen des untersuchten Metaboliten quantifizieren. Da auch noch sekundäre Faktoren der Handhabung eine Rolle spielen wie z. B. die Messung anderer Metabolite oder präparative Techniken zur Ermittlung der spezifischen Aktivitäten, schien es angezeigt, beide Applikationsverfahren anzuwenden. Für Tracer-Versuche war dabei keine positionsmarkierte Verbindung, sondern ausschließlich universal markierte ^{14}C -D-Milchsäure verfügbar.

Grundsätzlich war bei der Durchführung der Versuche in Betracht zu ziehen, daß die Dynamik der Eliminierung von D-Milchsäure aus dem Blut allein keine differenzierten Informationen über das eigentliche Stoffwechselschicksal zuließ. Es erschien darum wünschenswert, den Übergang von spezifischer ^{14}C -D-Milchsäure-Aktivität in andere Verbindungen (z. B. L(+)Milchsäure, Glucose) unter Anwendung entsprechender Präparationsverfahren aufzuklären. Insbesondere mußte aber auch damit gerechnet werden, daß eine konzentrationsabhängige Exkretion über die Nieren und/oder Hemmung der Oxidationsrate die Kinetik maßgeblich beeinflussen kann. Um dem Rechnung zu tragen, waren Messungen der $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation sowie der Harnausscheidung von D-Milchsäure und ^{14}C -Aktivität in anderer Form einzubeziehen.

Als Problem besonderer Art mußte die Frage nach der Beteiligung verschiedener Organe und Gewebe am D-Milchsäure-Stoffwechsel gesehen werden. Bisher durchgeführte Messungen (HINKSON u. Mitarbeiter, 1967; PRESTON u. NOLLER, 1973)

haben eigentlich nur den Schluß zugelassen, daß D-Milch-
säure kaum oder gar nicht metabolisiert wird. Organperfu-
sionen würden hier als geeignet erscheinen, wurden aber
wegen der geringen Kenntnisse über die Bedeutung einzel-
ner Organe als verfrüht angesehen. Einer Technik in vitro,
mit der Möglichkeit die Utilisation mehrerer unterschied-
licher Gewebeschnitte parallel zu messen, wurde darum der
Vorzug gegeben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Für die Infusionsversuche (s. 2.3.) standen zur Verfügung:
3 erwachsene (Alter: 4-6 Jahre) kastrierte männliche Merino-Landschafe (Q, T, V) mit einem Lebendgewicht von 91 kg (Q), 76 kg (T) und 77 kg (V);

4 erwachsene (Alter: 1 Jahr) ovariectomierte Deutsche Edelziegen mit einem Körpergewicht von 30 kg (B, D) bzw. 32 kg (A, C);

1 Deutsche Höhenfleckvieh-Kuh (Alter: 4 Jahre) mit einem Lebendgewicht von 570 kg.

Schafe und Ziegen waren in Einzelboxen, das Rind neben anderen in einem Anbindestall untergebracht. Die Tiere erhielten zweimal täglich Wiesenheu von guter Qualität (10-11.5 % Rohprotein und 27.5-29 % Rohfaser in der Trockenmasse) ad libitum und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Salzlecksteinen (Schafe und Ziegen). Das Rind erhielt daneben noch zweimal täglich eine Ration Kraftfutter (1 kg DLG III).

Bei der Durchführung der Infusionsversuche blieben die Tiere nüchtern (Beginn ca. 15 Stunden nach der Abendfütterung) und zum Teil (Hammel und Rind) in ihrer gewohnten Umgebung bei eingeschränkter Bewegungsfreiheit. Die Ziegen befanden sich während der Messungen aus versuchstechnischen Gründen (s.2.5.1.) in einem Stoffwechselkäfig im Tierversuchsraum des Radioisotopenlabors.

Für Untersuchungen an Gewebeschnitten standen Organproben (s. 2.5.2.) von zwölf 14 Wochen alten, mit Heu und Kraftfutter gefütterten Lämmern (18.1 - 30.0 kg KG) zur Verfügung.

Dieses Tiermaterial war in der Hauptsache für andere Untersuchungen (LANDES, 1975) bestimmt, war aber für unsere Versuchszwecke voll geeignet.

2.2. Operative Vorbereitung von Versuchstieren

Zu den Voraussetzungen für die Infusionsversuche gehörten neben der Gewöhnung aller Versuchstiere an versuchstechnische Manipulationen auch bestimmte operative Präparationen bei den Ziegen. Um eine Beeinflussung der Untersuchungen durch den Sexualzyklus zu vermeiden, wurden sie ovariectomiert.⁺

Zwei dieser Tiere erhielten außerdem ein Tracheostoma angelegt, um die Expirationsluft ohne Kontamination durch Pansengase gewinnen zu können.

Die Technik dieser Präparation wurde im Prinzip von FUJIHARA und Mitarbeitern (1973) übernommen, aber in Abweichung davon wie folgt modifiziert:

Beim Anlegen der Fistel wurde die Trachea nicht vollständig durchtrennt, sondern nur die betreffende knorpelige Trachealspange bis zum Ansatz des Musculus transversus tracheae. Dabei blieb der Muskel als Verbindung zwischen cranialer und distaler Trachea erhalten und es traten kaum Blutungen in die Trachea auf. Darüberhinaus sollte die modifizierte Technik einerseits den geraden Verlauf der Trachea und die Formstabilität des Tracheostoma erhalten.

Ebenfalls verändert wurde die auswechselbare Kanüle, die als Verschluß der Fistel in der versuchsfreien Zeit eine normale Atmung erlaubte. Sie bestand aus einem geraden, nicht-toxischen Weich-PVC-Rohr (Länge 70 mm, Außendurchmesser 15 mm, Innendurchmesser 11 mm), ließ sich leicht und rasch einsetzen bzw. herausnehmen, hatte dennoch einen dichten Sitz und minderte die Gefahr von Drucknekrosen der Trachealschleimhaut. Um Verschmutzung, Beschädigung und Verletzung einzuschränken, bekamen die Tiere einen Segeltuchkragen mit Klettverschluß umgelegt. Kontrolle und Pflege erfolgten 14tägig.

⁺Für die Durchführung wird der Gyn. Tierklinik (Vorstand: Prof. Dr. Leidl) gedankt.

2.3. Durchführung der Infusionsversuche

Alle Infusionsversuche wurden annähernd zur gleichen Tageszeit, morgens zwischen 8 und 9 Uhr, begonnen. Jeweils 60 und 30 Minuten vor Infusionsbeginn wurden Blutproben zur Ermittlung der Normalwerte von D(-) - und L(+)Milchsäure und teilweise Plasma-Glucose entnommen. Die weitere Gewinnung von Blutproben erfolgte zu Beginn in Abständen von 5, 10 und 20 Minuten, später in Abständen von 30 und 60 Minuten (s. Ergebnisse). Die Versuchsdauer betrug nach Kurzzeitinfusionen in der Regel 6 - 8 Stunden. Während dieser Versuchszeiten wurde auch Harn gesammelt (s. 2.4.2.).

Die Infusionen erfolgten mit Hilfe einer Walzenpumpe (Infusomat[®], Braun Melsungen) über einen Polyäthylen-dauerkatheter (s. 2.4.1.) in die Vena jugularis.

Bei allen Kurzzeitinfusionen wurde dabei möglichst rasch ein für jede Wiederkäuerspecies konstantes Volumen (Rind 800 ml, Schaf 400 ml, Ziege 150 ml) mit konstanter Infusionsrate (Rind 20 ml/min; Schaf und Ziege 10 ml/min) infundiert.

Bei allen Dauerinfusionen wurde unmittelbar vor dem mehrere Stunden (5 - 6 Stunden) lang andauernden konstanten Dosisstrom (Rind und Schaf 2 ml/min; Ziege 1 ml/min) eine Kurzzeitinfusion in der erwähnten Art als Startdosis ("priming dose") infundiert.

Bei "heißen" Dauerinfusionsversuchen an Ziegen schloß sich unmittelbar an die ¹⁴C-markierte Dauerinfusion eine "kalte" Dauerinfusion mit identischer Infusionsrate und Dosisstrom für 2 - 3 Stunden an (s. Ergebnisse).

Die Infusionslösungen waren in allen Versuchen racemische Milchsäurelösungen mit konstantem Isomerenverhältnis, aber unterschiedlichem Isomergehalt. Als Ausgangslösung stand 20 %ige synthetische, racemische Milchsäure⁺ mit einem

⁺Für die Überlassung der Sonderanfertigung wird der Fa. Boehringer u. Söhne, Ingelheim, gedankt.

enzymatisch bestimmten Isomerenverhältnis (s. 2.6.1.) von 45 % D(-) und 55 % L(+) zur Verfügung. Für Infusionslösungen wurde ein entsprechendes Volumen mit Lösungen von NaOH und KOH (Merck, Darmstadt) im Verhältnis 20 : 1 auf einen pH-Wert von 4.0 teilneutralisiert, mit Aqua tridest. aufgefüllt, autoklaviert (30 min bei 1.5 atü) und bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei +4°C gelagert.

Den Lösungen für radioaktiv markierte Kurzzeit- bzw. Dauerinfusionen wurde unmittelbar vor Infusionsbeginn die gewünschte Aktivität D(-) [β - ^{14}C]-Na-Lactat (Amersham Buchler, Braunschweig) zugesetzt.

2.4. Probengewinnung

2.4.1. Blutproben

Etwa 2 Stunden vor Infusionsbeginn wurden beiderseits in die Vena jugularis Dauerkatheter (Braunüle[®], Größe 1, Braun Melsungen) mit Mandrin gesetzt, an einer Halsseite für die Infusion, an der anderen zur Entnahme von Blutproben.

Aus der gestauten Vene wurden bei ^{14}C -markierten Infusionen Proben von 2 ml, bei den unmarkierten von 1 ml Vollblut entnommen, sofort zur Enteiweißung und Konservierung mit gleichen Volumina 0.6 N HClO_4 versetzt.

Bei Probenentnahme zur Glucosebestimmung wurden daneben noch 5 ml Blut in vorgekühlten Zentrifugenröhrchen auffangen. Pro ml Blut wurden 0.04 ml eines Koagulations- und Glykolysehemmers (10.0 g K-Oxalat, 5.0 g Na-Fluorid, Aqua dest. ad 200 ml) vorgelegt. Alle Proben wurden zentrifugiert (s. 2.6.1. u. 2.6.2.) und die klaren Überstände bis zur weiteren Aufarbeitung im Kühlschrank gelagert.

Bei einigen Versuchen (s. Ergebnisse) erfolgten außerdem vor und während der Versuchszeit Probennahmen in 30 bzw. 60 minütigem Abstand zur Mikrohämatocritbestimmung.

2.4.2. Harnproben

Die Methoden der Harnsammlung unterschieden sich bei den Versuchstieren:

Bei der Kuh wurde ein steriler Ballonkatheter (Rüsch Gold[®] Ballonkatheter Silkolatex[®], 40 cm lang, Durchmesser 30 Charrier; W. Rüsch, Rommelshausen) in die Harnblase verlegt und über einen Schlauch mit einem Sammelbehälter verbunden. Die Ziegen sollten zum Harnsammeln ebenfalls kateterisiert werden. Es zeigte sich jedoch, daß die Tiere an den permanenten Dehnungsreiz der Harnröhre nicht zu gewöhnen waren. Eine Oberflächenanästhesie (Anaesthesin[®] Salbe; Ritsert, Eberach) konnte die Versuchsbeeinträchtigung nur kurzfristig beheben. Es erwies sich daher als zweckmäßig, den Harn über einen maßgefertigten⁺, aufklebbaren PVC-Sammelbeutel mit Schlauchabfluß in ein Sammelgefäß abzuleiten.

Den Hammeln wurde ein Plastikbecher (BARTELMUS, 1975) untergebunden und nach jedem Harnabsatz manuell entleert. Von jeder spontan abgesetzten Harnfraktion wurde ein Aliquot (i. d. Regel 1 ml) mit gleichem Volumen 0.6 N HClO₄ versetzt, zentrifugiert und bis zur weiteren analytischen Bearbeitung kühl (+ 4°C) gelagert.

Neben Zeitpunkt und Volumen wurde in einzelnen Fällen auch der pH-Wert der Harnfraktionen festgehalten.

2.4.3. Organgewebeproben

Den Lämmern wurden unmittelbar nach Eintritt der Narkose (LANDES, 1975) die Organe Leber, Herz und Nieren sowie Pansen-schleimhaut entnommen und Teile davon sofort in eiskühlten mit reinem Sauerstoff begasten Atmungsbuffer (s.2.5.2.) eingebracht. Von diesen Organteilen wurden dann manuell Gewebeschnitte geringer Dicke ($\bar{x}=0.38 \text{ mm} \pm 0.11$; n=8) hergestellt,

⁺Die im Handel befindlichen Beutel erwiesen sich wegen der kastrationsbedingten Unterentwicklung der Vulva als zu groß.

ihr Naßgewicht bestimmt und in die Inkubationsgefäße übergeführt. Von der Organgewinnung bis zu diesem Schritt wurden in der Regel weniger als 10 Minuten benötigt. Um den Gehalt (%) an Trockenmasse der betreffenden Organe zu ermitteln, wurden weitere Gewebestücke von ca. 1 g Gewicht in parallelen Ansätzen bei 75 °C im Trockenschrank mit Umluft bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Außerdem wurden die jeweiligen Organgewichte festgehalten.

2.5. Technik der ^{14}C - Stoffwechselfmessung

2.5.1. Exhalationsmessung an Ziegen

Nach Entnahme der Verschlusskanüle und Säuberung der Trachea wurde über das Tracheostoma ein flexibler Tubus (Endotrachealkatheter aus Latex mit Spirale, Ballon und Kontrollballon, Länge 36 cm, Durchmesser 38 Charrier; W. Rüschi, Rommelshausen) ca. 5 cm in Richtung Lunge vorgeschoben und mit Hilfe des Ballons fixiert. Um die Trachealschleimhaut dabei möglichst wenig zu reizen, wurde der eingeführte Tubusabschnitt mit einem Oberflächenanästhetikum (Anaesthesin[®]-Salbe; Ritsert) bestrichen.

Ein Zwei-Wege Atemventil (Ambu[®]-Hesse-Rubenventil mit einem extrem niedrigen Widerstand; Original Hanau, Quarzlampen GmbH, Hanau) im direkten Anschluß an den Tubus regelte den Fluß des Inspirations- und Expirationsluftstromes (s. Abb. 1).

2.5.2. Stoffwechselfmessungen an Gewebeschnitten

Zur Ermittlung der Oxidation von D(-)Milchsäure in Herz, Leber, Niere und Pankasschleimhaut von Lämmern (s. 2.4.3.) wurden Gewebeschnitte im Warburg-Apparat (Braun, Melsungen) mit ^{14}C -U-D(-) markiertem Milchsäureracemat inkubiert, das gebildete $^{14}\text{CO}_2$ in KOH aufgefangen und anschließend gemessen.

Zur Inkubation der verschiedenen Gewebe dienten konische Warburg-Gefäße von ca. 16.5 ml Volumen, mit Zentralwanne und zwei Anhangsbirnen mit folgendem Inkubationsansatz:

Hauptraum:	1.5 ml O_2 -begaster Phosphatpuffer ⁺ und ein Gewebeschnitt (20 - 60 mg)
Zentralwanne:	0.2 ml 10 %ige KOH-Lösung
Anhangsbirne A:	0.2 ml Substrat = 40μ Mol ^{14}C -U-D(-)- racemische Milchsäurelösung mit einem Isomerenverhältnis von 55 % L(+) und 45 % D(-) sowie einer spezifischen Aktivität von $4936 \mu Ci \cdot mMol^{-1} D(-) Lactat$
Anhangsbirne B:	0.2 ml 1 N H_2SO_4

Nach Substratzugabe (Anhang A) wurde bei $37^\circ C$ und einer Frequenz von 86 Schwingungen $\cdot min^{-1}$ 120 Minuten lang geschüttelt, danach H_2SO_4 (Anhang B) zugekippt und noch weitere 30 Minuten geschüttelt, um das aus dem angesäuerten Medium ausgetriebene $^{14}CO_2$ in der Kalilauge aufzufangen. Anschließend wurde die KOH quantitativ entnommen, in einem Zählfläschchen mit 10 ml Scintillator (Insta-Gel[®]; Packard) versetzt und im Tricarb[®] gemessen. Im Inkubationsmedium wurde die spezifische Aktivität bestimmt.

Die Berechnung der D(-)Milchsäureoxidation (als mMol Lactat-Kohlenstoff) erfolgte unter Berücksichtigung des Trockengewichtes der jeweiligen Gewebeschnitte und der Inkubationsdauer.

2.6. Analytische und präparative Methoden

2.6.1. Enzymatische Bestimmung der Milchsäureisomeren

Alle enzymatischen Milchsäurebestimmungen wurden in 0.3 N $HClO_4$ -saurer Lösung vorgenommen, wobei biologisches Probenmaterial (Vollblut, Harn) vorher bei 15000 g 10 min zentrifugiert wurde, um einen klaren Überstand für die Bestimmung zu erhalten.

⁺nach ELLIOTT (1955)

Der enzymatischen Bestimmung lag folgendes Prinzip zugrunde:



Als Meßgröße diente dabei die durch Zunahme der NADH_2 -Konzentration bedingte Extinktionsänderung (ΔE) bei 366 nm im Eppendorf-Photometer.

Die Bestimmung von L(+) bzw. D(-)Milchsäure erfolgte in Anlehnung an HOHORST, GAWEHN und BERGMEYER (1970) nach den Angaben der Fa. Boehringer mit L(+)- bzw. D(-)Lactatdehydrogenase (L(+)LDH aus Schweinemuskel, EC 1.1.1.27; D(-)LDH aus *Lactobacillus leichmannii*, EC 1.1.1.28; Boehringer).

2.6.2. Enzymatische Bestimmung der Blutglucose

Glucosekonzentrationen wurden im Blutplasma (5 min bei 7100 $\cdot$ g zentrifugiert) und im Säuleneluat bei der Glucose-Isolierung (s. 2.6.4.) nach BERGMEYER und BERNT (1962) mit der Glucoseoxydase-Peroxydase-Methode bestimmt. Die Wiederfindensrate betrug bei 4 verschiedenen Standardkonzentrationen mit jeweils 5-fachen Ansätzen im Mittel 99.7 %. Alle Bestimmungen wurden mit den Reagenzien der Biochemica-Testkombination (GOD-Perid[®]; Boehringer) entsprechend den zugehörigen Arbeitsvorschriften (Inkubation: 40 min bei Raumtemperatur; Messung: bei 578 nm im Eppendorf-Photometer) durchgeführt.

2.6.3. Präparative Trennung der Milchsäure-Isomeren

Um die spezifische Aktivität des ^{14}C -markierten D(-)Isomers in Blut- und Harnproben bestimmen zu können, war die Ausarbeitung einer zuverlässigen präparativen Methode zur Abtrennung vom L(+)Isomer erforderlich. Grundlage dieser Methode war eine von ALIZADE und SIMON (1972) beschriebene chemische Fällungsreaktion für Keto-Verbindungen. Das zu isolierende Isomer wurde enzymatisch zum Pyruvat umgesetzt (s. 2.6.1.) und nach Zugabe von exogenem Pyruvat

(0.5 ml = 300 μ Mol Na-Pyruvat; Roth, Karlsruhe) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (3 ml = 363 μ Mol in 30 %iger HClO_4 ; Merck, Darmstadt) als Hydrazon ausgefällt. Das gelbe Präzipitat wurde dann über ein quantitatives Rundfilterpapier im Filtertiegel abgesaugt, mit Aqua dest. ausgewaschen und zusammen mit dem Filterpapier getrocknet. Papier und Niederschlag wurden dann zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität im Sample-Oxidizer verbrannt (s. 2.6.5.).

Außer im D(-)Isomer wurde auch versucht in parallelen Ansätzen die ^{14}C -Aktivität im Pyruvat und im L(+)Isomer zu bestimmen. Die Differenz zwischen der Aktivität im Hydrazon nach enzymatischer Umsetzung (= D(-)- bzw. L(+)- und Pyruvat-Aktivität) und der Aktivität im Hydrazon ohne vorherige enzymatische Umsetzung (= Pyruvat-Aktivität) ergab die reine Isomeren-Aktivität. Daneben sollte wiedergefundene Aktivität im L(+)Isomer einen Hinweis auf eine mögliche Racemisierung geben.

Aus zahlreichen Vorversuchen ergab sich für diese Isomeren-Präparation eine Wiederfindensrate von $80.3\% \pm 2.69$ ($n = 25$) für D(-)Isomerenaktivität und von $80.25\% \pm 2.99$ ($n = 15$) für ^{14}C -L(+)Isomerenaktivität. Die Bestimmung der Wiederfindensrate erfolgte im zu erwartenden Konzentrationsbereich der Proben (Blut- und Harnproben) aus Infusionsversuchen.

2.6.4. Isolierung der Blutglucose zur Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die Isolierung der Glucose aus dem Blutplasma und die Bestimmung ihrer ^{14}C -Aktivität zur Ermittlung der Syntheserate aus D(-)Lactat-Kohlenstoff erfolgte im wesentlichen nach der von SCHMIDT und Mitarbeitern (1975) beschriebenen Methode über eine Anionenaustausch-Säule.

Ein Teil der Blutplasmaproben (2 ml) wurde nach der Methode von SOMOGYI (1945) enteiweißt (Probenverdünnung 1 : 10) und bei $15000 \cdot g$ 10 min zentrifugiert. Vom klaren Überstand mit $\text{pH} = 7$ - für eine optimale Trennung der organischen Säuren mit niedrigem pK -Wert von Glucose war dieser pH -Wert

notwendig - wurden 15 ml auf die Säule aufgetragen. Die ersten 6 ml des Eluates wurden verworfen. Von den folgenden 6 ml wurden 5 ml in Szintillationszählfläschchen übergeführt und für die ^{14}C -Glucoseaktivitätsbestimmung im Tri-Carb[®] (s. 2.7.2.) auf 1 ml eingengt. Der Rest dieser 2. Fraktion diente zur enzymatischen Glucosebestimmung (s. 2.6.2.). Es zeigte sich dabei, daß der Glucoseverlust bei dieser Prozedur der Auftrennung über Ionenaustausch-säule nur 0.7 % betrug.

2.6.5. Aufbereitung ^{14}C -markierter Proben im Sample-Oxidizer

Proben, die wegen eines zu hohen Quenches nicht direkt im Tri-Carb[®] gemessen werden konnten, sowie feste Proben wurden zunächst in einem Sample Oxidizer (Tri-Carb[®] Sample Oxidizer, Modell 306; Packard) aufbereitet. Dieser trennt automatisch durch vollständige, nicht katalytische Verbrennung ^3H - und ^{14}C -markierte Proben für den Flüssigszintillationszähler auf. Unsere Proben enthielten nur ^{14}C -Aktivität, so daß es genügte das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ in Absorptionslösung (9 ml Carbo-Sorb[®]; Packard) aufzufangen und nach Zusatz von Szintillationsflüssigkeit (12 ml Permafluor[®]; Packard) zu messen. Um die Ausbeute (%) d. h. den beim Verbrennungs- und Zählvorgang auftretenden ^{14}C -Aktivitätsverlust der Proben feststellen zu können, wurden zwischen- durch mehrmals bestimmte Mengen eines ^{14}C -Standards mit bekannter Aktivität verbrannt und ausgezählt.

2.7. Radiometrische Messungen

2.7.1. Exhalationsradiometrie

In einem Exhalationsmessgerät (Exhalameter FHT 50 B; Friesseke und Hoepfner GmbH, Erlangen-Bruck) erfolgten simultane Messungen des CO_2 -Gehaltes durch Infrarotspektrometrie und der ^{14}C -Aktivität über einen Methandurchflußzähler (s. Abb. 2). Der Nutzeffekt der ^{14}C -Messung betrug dabei 13.5 %.

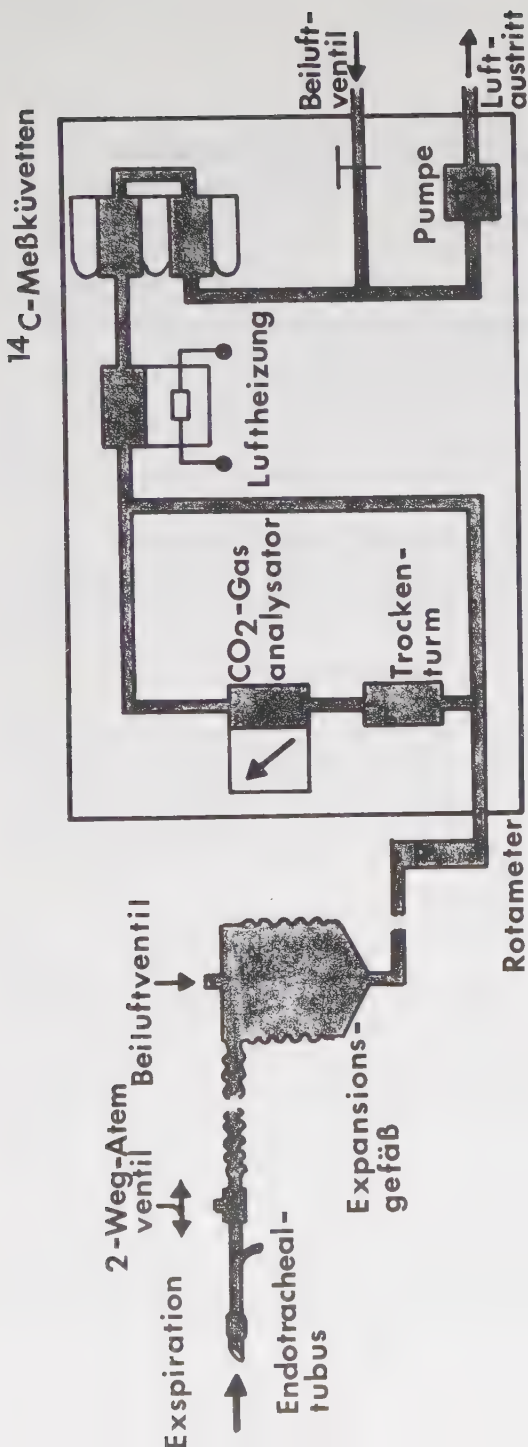


Abb. 2 Schematische Darstellung der $^{14}\text{CO}_2$ - Exhalationsradiometrie

Ein Mehrpunktschreiber zeichnete folgende Meßdaten auf: Impulsrate und prozentualen CO_2 -Gehalt, die Integrale dieser Meßgrößen sowie den Quotienten aus Impulsrate und CO_2 -Gehalt.

Die pro Zeiteinheit ausgeatmete ^{14}C -Aktivität a ($\mu\text{Ci}/\text{min}$) ließ sich aus der gemessenen Impulsrate I ($\text{Imp.}/\text{min}$), der Gasdurchflußmenge GF (cm^3/min) und einer Eichkonstanten K_1 wie folgt berechnen:

$$a = \frac{I \cdot GF}{K_1}$$

Die pro Zeiteinheit ausgeatmete CO_2 -Menge b hing bei Vernachlässigung des CO_2 -Gehaltes der Luft nur von dem gemessenen prozentualen CO_2 -Gehalt D und der Gasdurchflußmenge GF ab:

$$b = K_2 \cdot D \cdot GF$$

Aus abgeatmeter ^{14}C -Aktivität (^{14}C) und CO_2 -Menge (c) ließen sich schließlich auch die spezifische Aktivität $SA = ^{14}\text{C} \cdot c^{-1}$) und die standardisierte spezifische Aktivität ($\text{stSA} = ^{14}\text{C} \cdot \text{kg G} \cdot c^{-1} \cdot ^{14}\text{C-Dosis}^{-1}$) berechnen.

2.7.2. ^{14}C -Aktivitätsmessung im Flüssig-szintillationszähler

Für die Messung der ^{14}C -Aktivität stand ein Flüssigszintillationszähler (Liquid scintillation spectrometer, Model 3375; Packard) zur Verfügung. Dazu wurde von den Proben, die nicht im Sample Oxidizer aufbereitet wurden, 0.5 ml zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit nach BRAY (1960) abgefüllt und 5 min ausgezählt.

Die Bestimmung der Zählausbeute erfolgte jeweils im Anschluß an die erste Zählung der Proben durch Zusatz eines ^{14}C -Standards mit bekannter Aktivität und erneuter Impulszählung.

2.8. Kinetische Parameter des D-Milchsäure- Stoffwechsels sowie deren Berechnung

Bei der Untersuchung des Stoffwechselverhaltens von D-Milchsäure bei Wiederkäuern in vivo mit Hilfe mathematischer Parameter ist von folgenden Annahmen auszugehen:

1. D-Milchsäure wird nach intravenöser Kurzzeit- oder Dauerinfusion vom Blut aus in verschiedenen Anteilen und mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten auch auf andere Teilbereiche des Organismus (= Kompartimente) verteilt.

2. Der Verlauf der Konzentration von D-Milchsäure im Blut nach oder während der Applikation spiegelt die Summe der in allen Kompartimenten ablaufenden Vorgänge wie Invasion, Verteilung, Verdünnung, Retention, Metabolisierung und/oder Eliminierung wieder.

3. Unter Elimination ist jeder Vorgang zu verstehen, der D-Milchsäure aus dem Blut verschwinden läßt, wobei Verschwinden gleichbedeutend ist mit dem Entzug der Nachweisbarkeit so z. B. durch Ausscheidungsvorgänge, Fixation im extravasalen Raum, chemische Umwandlung usw.

4. Die fiktive Anfangskonzentration a im Blut ist diejenige Konzentration von D-Milchsäure, die sich ergeben würde, wenn sich die rasch infundierte Milchsäure-Dosis bereits zur Zeit $t = 0$ in einem Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und anderen Kompartimenten befindet.

Berechnung von $a = a_1$ (Konzentration im intravasalen Kompartiment) bzw. a_2 (Konzentration im gesamten extravasalen Kompartiment) und des Verteilungsquotienten (a_2/a_1) nach den Angaben von DOST (1968).

5. Radioaktiv markierte D-Milchsäure verhält sich biokinetisch und metabolisch ebenso wie die entsprechende unmarkierte Verbindung, ohne dabei jedoch die vorhandenen physio-

logisch-chemischen Verhältnisse von sich aus grundlegend zu beeinflussen.

Kinetische Terminologie:

Da für eine kinetische Beschreibung von Stoffwechselvorgängen keine international vereinheitlichten Begriffe und Symbole zur Verfügung stehen, bedarf es für ein uneingeschränktes Verständnis kinetischer Daten jeweils einer gesonderten Erläuterung der verwendeten Terminologie und Symbole.

Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten Begriffe, Symbole und Berechnungsansätze waren die Arbeiten von ROBERTSON (1956), ZILVERSMIT (1960), DOST (1968), SHIPLEY u. CLARK (1972) und HARMEYER u. Mitarbeiter (1973).

Verteilungsraum (V) und Distributionskoeffizient (Δ)

ist dasjenige Volumen pro Tier bzw. pro kg G, das Milchsäure bei angenommener Gleichverteilung im Wiederkäuerorganismus beanspruchen würde.

$$V = \frac{D}{a} \stackrel{a)}{=} \frac{T_f}{y^* \cdot k} \stackrel{b)}{=} \frac{T_f SA}{y_{SA}^* \cdot k_{SA}} \stackrel{c)}{=} \quad (1)$$

$$\Delta = \frac{D}{a \cdot G} \stackrel{a)}{=} \frac{V}{G} \stackrel{a)b)c)}{=} \quad (1/\text{kg G})$$

(D = Dosis; T_f = Transfer; y^* = Konzentrationsplateau; SA = spezifische ^{14}C -Aktivität von D-Milchsäure)

-
- a) nach Kurzzeitinfusion
 - b) nach Beendigung der Dauerinfusion
 - c) im künstlichen Fließgleichgewicht

Kompartiment (Kp)

ist eine Fraktion von V, die einen anatomisch umgrenzten Bezirk (z. B. Organ), bestimmte histologische Strukturen (z. B. Gewebe) oder auch ein biokinetisch und funktionell einheitliches Ganzes darstellen kann.

$$Kp_1 + Kp_2 + \dots + Kp_n = V \quad (1)$$

Pool (Pl)

ist der Gesamtbestand von D-Milchsäure im Verteilungsgleichgewicht, soweit er sich in einem ihm zugeordneten, bestimmbareren Verteilungsraum bzw. Kompartiment erfassen läßt.

$$Pl = V \cdot a = D^{a)} = V \cdot y^{*b)} = \frac{Tf^{c)}}{k_{SA}} \quad (mg)$$

Eliminationsparameter nach Kurzzeit- und Dauerinfusion bei Anwendung eines 1-Kompartiment-Modell:

$$\text{Konzentrationsverlauf } y(t): y = a \cdot e^{-k \cdot t} \quad (mg/l)$$

$$\text{Elimin.geschwindigkeit (v): } v = \frac{dy}{dt} = -k \cdot y \quad (mg/min)$$

$$\text{Elimin.konstante (k): } k = 2.303 \frac{\Delta \log y}{\Delta t} \quad (min^{-1})$$

$$\text{biol. Halbwertszeit (T 1/2): } T \ 1/2 = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k} \quad (min)$$

a) nach Kurzzeitinfusion

b) nach Beendigung der Dauerinfusion

c) im künstlichen Fließgleichgewicht

Eliminationsparameter im künstlichen Fließgleichgewicht:

Transfer (-rate) (Tf)

ist die Menge an D-Milchsäure, die pro Zeiteinheit in einen vorhandenen Pool eintritt bzw. ihn wieder verläßt.

$$Tf = \frac{k \cdot Pl}{G} \quad (\text{mg/kg} \cdot \text{min})$$

Transferkonstante (k)

ist der Teil des Pools, der pro Zeiteinheit beseitigt bzw. ersetzt wird.

$$k = \frac{Tf}{Pl} \quad (\text{min}^{-1})$$

Transferzeit $\left(\frac{1}{k} \right)$

ist diejenige Zeit, die erforderlich ist, den gesamten gleichverteilten D-Milchsäure-Pool einmal zu erneuern.

$$\frac{1}{k} = \frac{Pl}{Tf} \quad (\text{min})$$

2.9. Statistische Methoden

Die Meß- bzw. Rechenergebnisse wurden als Einzelwerte und dort wo möglich als Mittelwerte ($\bar{x}$) und Streuungen ($\pm s$) wiedergegeben.

Zur Berechnung von linearen und nicht-linearen Regressionen (linearisierende Transformation nach SACHS, 1972) und deren Korrelationskoeffizienten dienten die von SACHS (1972) angegebenen Methoden. Die Prüfung der Korrelationskoeffizienten auf Signifikanz gegen Null erfolgte für die zugehörigen Freiheitsgrade mit Hilfe einer Signifikanz-Tabelle für r (Documenta Geigy, 1968).

3. ERGEBNISSE

3.1. Kinetik der Konzentrationsabläufe von D(-)Milchsäure im Blut von Ziege, Schaf und Rind

Eine kinetische Betrachtungsweise des Stoffwechsels von D(-)Milchsäure bezieht ihre Daten im wesentlichen aus der Beobachtung von Konzentrationsverläufen des Stoffes und gegebenenfalls auch von dessen Metaboliten innerhalb des Gesamtorganismus bzw. der einzelnen Kompartimente. Es ist dabei ein Kennzeichen der Stoffwechselkinetik, daß die Verarbeitung ihrer Daten eine mathematische Beschreibung der zugrunde liegenden Stoffwechselvorgänge ermöglicht, wodurch bis dahin verborgen gebliebene, allgemeine und spezielle Beziehungen zwischen D(-)Milchsäure und Wiederkäuerorganismus zum Vorschein gebracht werden können. Dabei vermag kein anderes Organ derartige Stoffwechselbeziehungen besser zu repräsentieren als das strömende Blut in seiner Eigenschaft als wichtigstes Organ des Stofftransportes. Als Maßstab dieser Beziehungen zu jeder beliebigen Zeit nach Aufnahme von D(-)Milchsäure wird daher deren Konzentration im Blut herangezogen. Dabei gilt der ursprüngliche Stoffwechselzustand (= Stoffwechselgleichgewicht) als wieder hergestellt, wenn die D(-)Milchsäure-Konzentration im Blut nicht mehr erkennbar vom Ausgangswert abweicht. Daher war zunächst dieser Ausgangsblutspiegel für D(-)Milchsäure (= Normalspiegel) bei den Versuchstieren zu bestimmen, bevor die dynamischen Prozesse nach gezielter Applikation untersucht werden konnten.

3.1.1. Normalspiegel von Milchsäure-Isomeren

Zur Ermittlung der Normalkonzentration von Milchsäure-Isomeren im Blut wurden 1 Stunde und unmittelbar vor Infusionsbeginn gewonnene Proben der enzymatischen Analyse zugeführt. Dabei ergaben sich neben normalen L(+)Milchsäure-

Spiegeln auch Werte für D(-)Milchsäure, die in Tabelle 3 wiedergegeben sind. Letztere lagen allerdings im Bereich der 3-fachen Standardabweichung der Blutleerwerte, die als Nachweisgrenze für die enzymatische D-Milchsäure-Bestimmung angesetzt wurde. Sie konnten damit nicht als spezifische Spiegel angesehen werden. Um diese Beurteilung zu sichern, wurden bei je 2 Ziegen, Schafen und Rindern zu zwei verschiedenen Tageszeiten 25 ml Vollblut entnommen, enteiweißt, auf 1/10 des ursprünglichen Volumens eingeeengt und anschließend der Gehalt an D-Milchsäure bestimmt. Die erhaltenen Werte (vgl. Tab. 3) lagen trotz mehrfacher Konzentrierung im gleichen Bereich. Sie mußten damit als unspezifisch für D-Milchsäure beurteilt werden.

Eine Bestätigung für diesen Befund eines fehlenden, physiologischen D-Milchsäurespiegels im Blut der Versuchstiere lieferten Infusionsversuche mit ^{14}C -D-Milchsäure (s. Abb. 3). Hier entsprach die spezifische Aktivität (SA) von D-Milchsäure im Blut unverändert derjenigen der Infusionslösung. Demzufolge war eine bestimmte D-Milchsäuredosis D nach Applikation gleichsam als insgesamt vorhandener D-Milchsäure-Pool P1 zu betrachten ($D = P1$).

3.1.2. Dynamik der D-Milchsäure-Konzentration im Blut nach intravenöser Applikation

Nach den im vorangegangenen Abschnitt angeführten Befunden ließ sich keine endogene D-Milchsäure-Bildung nachweisen. Damit bot sich die Möglichkeit, den Konzentrationsverlauf von D-Milchsäure nach exogener Zufuhr direkt zur Ermittlung stoffwechselkinetischer Größen zu verwenden.

Die Methoden der Wahl für die Erlangung eines rasch auftretenden Konzentrationsgipfels bzw. eines permanenten Spiegels von D-Milchsäure im Blut der Versuchstiere sind die exogenen Belastungen mittels intravenöser Kurzzeitinfusion bzw. Dauerinfusion. Beide Methoden gemeinsam an-

Tabelle 3

Normalspiegel von L(+)Milchsäure und scheinbare Konzentration von D(-)Milchsäure vor und nach Konzentrierung im Blut von Ziege, Schaf und Rind

		Milchsäurekonzentration (mg/l)		
		L(+)Isomer	D(-)Isomer	D(-)Isomer nach Konzentrierung
Ziegen (A,B,C,D)	n	13	13	4
	$\bar{x}$	78.1	3.6	1.7
	$\pm s$	21.9	4.7	2.4
Schafe (Q,R,T,V,)	n	20	20	4
	$\bar{x}$	95.5	2.6	3.2
	$\pm s$	37.2	2.6	2.5
Rinder (H,O)	n	3	3	4
	$\bar{x}$	51.3	6.0	3.8
	$\pm s$	18.5	2.0	3.5

gewandt sind in vorzüglicher Weise zur Klärung stoffwechselkinetischer Probleme geeignet.

Das besondere Gewicht der Kurzzeitinfusion liegt bei der Klärung der Verteilungs- und Eliminationskinetik, das der Dauerinfusion ebenfalls bei der Eliminationskinetik sowie der Erfassung und Quantifizierung von Eliminationsmechanismen.

3.1.2.1. Konzentrationsverlauf nach Kurzzeitinfusion

Die graphische Darstellung der Kurzzeitinfusionsversuche in einem Diagramm mit linearen Koordinaten zeigt, daß der Blutspiegel (y) von D-Milchsäure auch nach unterschiedlich hoher Belastung in jedem Fall exponentiell auf seinen Ausgangswert ($y_0 = 0$) abfällt.

Die halblogarithmische Darstellung derartiger Blutkonzentrationen erbringt einen ungewöhnlichen, komplexen Kurvenverlauf: Der Konzentrationsabfall setzt sich je nach Höhe der erreichten Ausgangskonzentration von D-Milchsäure im Blut bei der Ziege aus bis zu 3, bei Schaf und Rind sogar bis zu 4 unterschiedlichen, linearen Kurvenabschnitten zusammen. In Abbildung 3 ist dies am Beispiel eines Versuches bei der Ziege gezeigt.

Diese Art der Transformation in eine lineare Beziehung zwischen Konzentration (y) und Zeit (t) war Grundlage der weiteren Berechnungen zur Verteilungs- und Eliminationskinetik. Wird der Verlauf einer Blutspiegelkurve normalerweise durch Invasion und durch Elimination eines Stoffes bestimmt, so ergibt sich bei protrahierter Invasion (z.B. enterale Resorption) als Verlauf der Konzentration im Blut eine Kurve, die aus einer gleichzeitig aufsteigenden (Invasion) und einer abfallenden (Elimination) e-Funktion resultiert.

Nach der raschen intravenösen Applikation eines Stoffes wie z. B. nach Kurzzeitinfusion von D-Milchsäure entspricht der Konzentrationsverlauf dagegen völlig der Eliminationsfunktion. Dabei ist zu beobachten, daß zu Be-

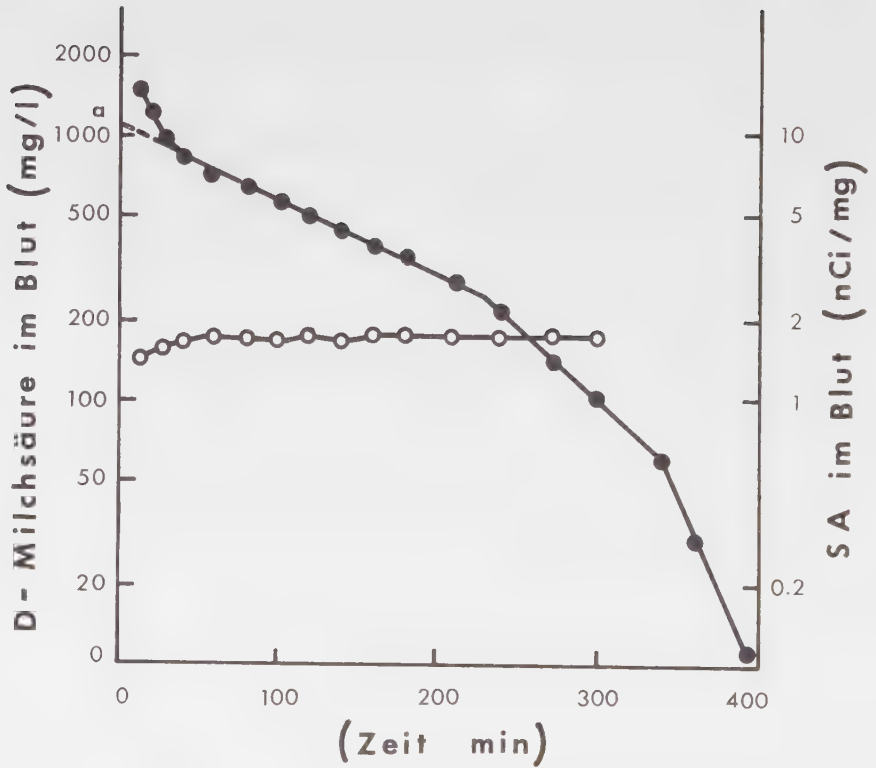


Abb. 3 Konzentration (●) und spezifische Aktivität SA (○) von D-Milchsäure im Blut von Ziege D nach Kurzzeitinfusion von DL-Milchsäure

Dosis: 493 mg/kg (1.7 nCi/mg) D-Milchsäure

ginn des Konzentrationsverlaufes die Elimination noch von Verteilungsvorgängen überlagert wird. Die Dauer einer solchen Gleichgewichtseinstellung zwischen Kreislaufflüssigkeit und Gewebe ist dabei im wesentlichen von der Infusionsgeschwindigkeit, der Diffusion sowie der Größe des Verteilungsvolumens abhängig. Extrapoliert man den anschließenden geradlinigen Kurvenabschnitt auf die logarithmisch geteilte Ordinate (gestrichelter Verlauf in Abb.3), so erhält man zur Zeit $t = 0$ einen Ausgangsblutspiegel ($y_t = a$), der dem fiktiven Blutspiegel a entspricht. Letzteren würde man erhalten, wenn sich die gesamte D-Milchsäure-Dosis unmittelbar nach vollendeter Infusion im Verteilungsgleichgewicht befände. Dieser fiktive Wert a ist für die weiteren Berechnungen der Verteilungs- und Eliminationskinetik von D-Milchsäure nach Kurzzeitinfusion von grundlegender Bedeutung. Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, ist diese Anfangskonzentration für den angewandten Dosierungsbereich von 50 - 500 mg/kg G deutlich mit der applizierten Dosis korreliert:

$$y = 219.8 + 2.54 \times x \quad (r = 0.966)$$

Eine Erhöhung der D-Milchsäure-Belastung von 50 auf 500 mg/kg hat demnach mit 1475 mg/l einen ca. 4-fach höheren, gleichverteilten Blutspiegel zur Folge. Diese für alle 3 Wiederkäuerspecies gemeinsame enge Beziehung zwischen Dosis und Konzentration im Blut läßt vermuten, daß der zur Verfügung stehende Verteilungsraum pro kg G sowie die Verteilungsmechanismen für Ziege, Schaf und Rind weitgehend identisch sind. Die Diskrepanz zwischen einem fehlenden Normalspiegel von D-Milchsäure im Blut und der Tatsache, daß entsprechend der Beziehung aus Abbildung 4 für die Dosis $x = 0$ mg/kg ein Blutspiegel von 219.8 mg/l resultieren würde, macht die Gültigkeit der obigen Beziehung für Belastungen von $D < 50$ mg/kg G unwahrscheinlich.

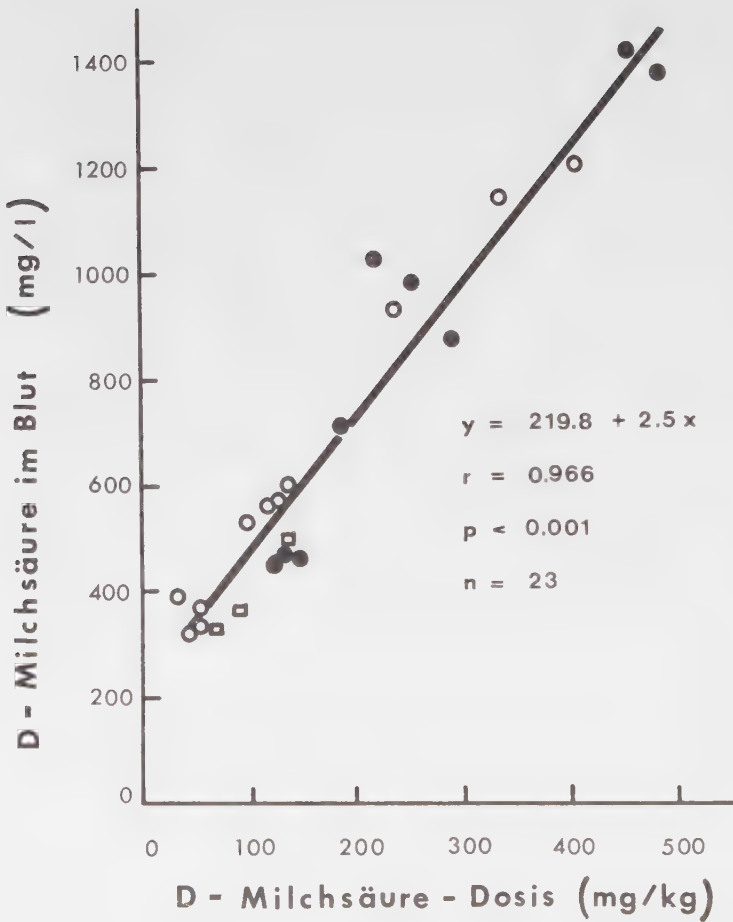


Abb. 4 Anfangskonzentration (a) von D(-)Milchsäure (extrapoliert) im Blut nach Kurzzeitinfusion von DL-Milchsäure bei Ziege (●), Schaf (○) und Rind (◻)

3.1.2.2. Konzentrationsverlauf bei Dauerinfusion

Der Konzentrationsverlauf des D-Isomers während einer Dauerinfusion mit konstantem Dosisstrom D/t resultiert aus dem Zusammenwirken von linearer Invasion und exponentieller Elimination. Ein künstliches Fließgleichgewicht mit einem Konzentrationsplateau (s. Abb. 5) stellt sich ein, sobald sich beide Vektoren quantitativ entsprechen. Um dieses Konzentrationsplateau möglichst rasch zu erhalten, empfiehlt es sich unmittelbar vor Beginn der Dauerinfusion eine Startdosis zu verabfolgen. In den vorliegenden Versuchen war unter derartigen Bedingungen das künstliche Fließgleichgewicht in der Regel nach 2 - 3 Stunden erreicht. Die Überprüfung aller Versuche auf einen Zusammenhang zwischen Dosisstrom und dem jeweiligen Plateau (y^*) des D-Isomers ergab für Ziege und Schaf bei $0.5 - 2.0 \text{ mg/kg} \cdot \text{min}$ entsprechend $200 - 1500 \text{ mg/l}$ tierartlich unterschiedliche, linear korrelierte Beziehungen (s. Abb. 6). Der Unterschied dieser Beziehungen zwischen Schaf und Ziege wird bei steigendem Dosisstrom größer, und zwar um den Faktor 1.6. Die Einstellung einer niedrigeren Fließgleichgewichtskonzentration bei der Ziege mit gleichem Dosisstrom wie beim Schaf läßt vermuten, daß die Eliminationsgeschwindigkeit beim letzteren niedriger ist. Nimmt man zur Erläuterung dieses Unterschiedes einmal an, die genannten Beziehungen zwischen Dosis und Blutspiegel würden auch für Dosisströme von $D/t \leq 0.8$ (Ziege) bzw. $D/t \leq 0.5 \text{ mg/kg G} \cdot \text{min}$ (Schaf) gelten. Dann würde ein konstanter Resorptionsfluß der D-Milchsäure von $0.5 \text{ mg/kg} \cdot \text{min}$ aus dem Verdauungstrakt beim Schaf ein D-Milchsäure-Plateau von 200 mg/l , bei der Ziege dagegen keinen meßbaren Blutspiegel verursachen. Auf ihr Körpergewicht bezogen könnten die Ziegen demnach mit $22 \text{ g D-Milchsäure pro Tag}$ nahezu die gleiche Menge wie die $2 \frac{1}{2}$ mal so schweren Schafe ohne meßbaren Blutspiegel resorbieren. Das Absetzen der Dauerinfusion, bei den meisten Versuchen nach 5 - 6 Stunden, führte erwartungsgemäß zu einem mehr-

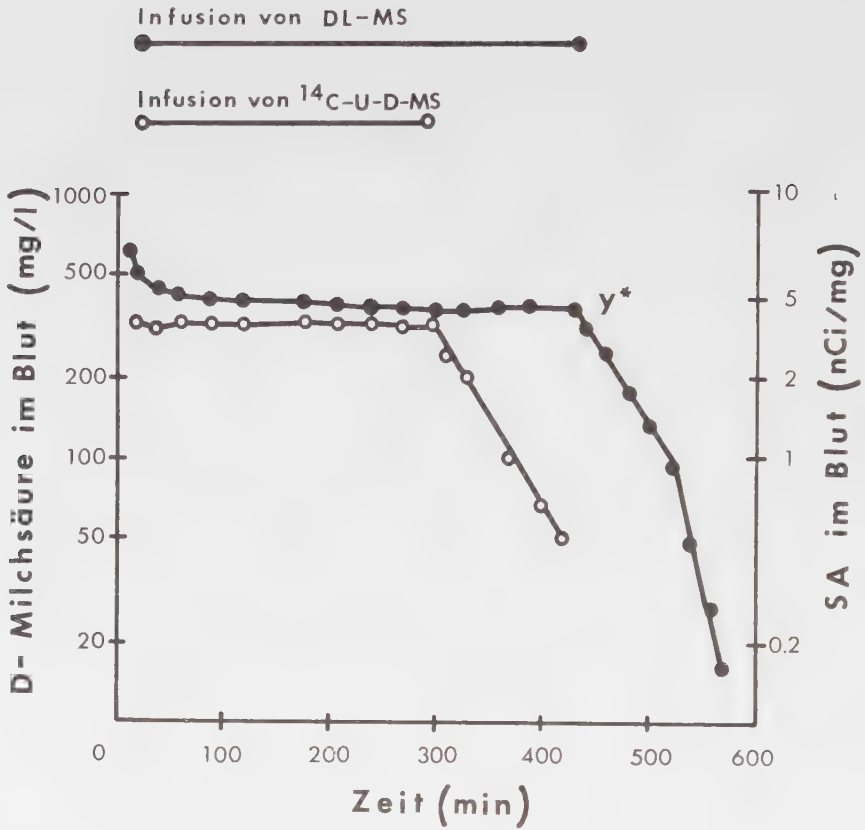


Abb. 5 Konzentration (●) und spezifische Aktivität SA (○) von D-Milchsäure im Blut der Ziege D nach Dauerinfusion von DL-Milchsäure

Startdosis:	167 mg/kg;	5.0 nCi/mg	D-Milch- säure
Dauerinfusion:	1.2 mg/kg;	3.3 nCi/mg	

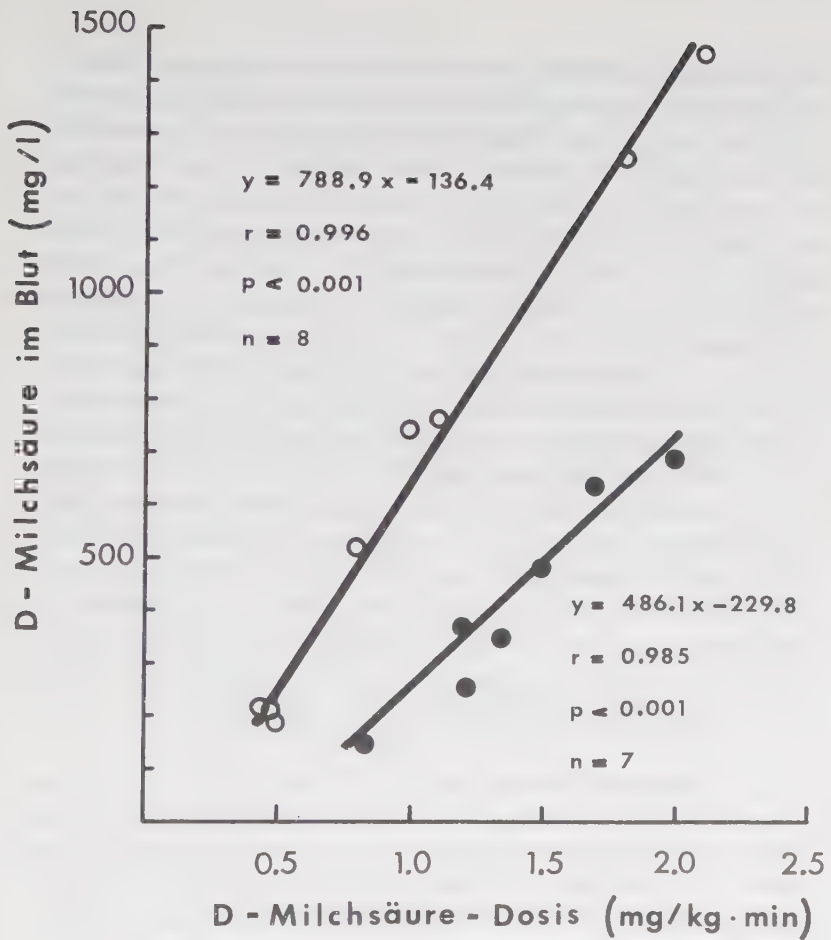


Abb. 6 Beziehungen zwischen dem Dosisstrom und dem Blutspiegel (y^*) von D-Milchsäure bei Dauerinfusion von DL-Milchsäure bei 2 Ziegen (●) und 2 Schafen (○)

stufigen exponentiellen Abfall des D-Milchsäurespiegels, dessen eliminationskinetische Auswertung in gleicher Weise erfolgte wie beim Konzentrationsabfall nach Kurzzeitinfusion. Dem Zeitpunkt des Abbruches der Infusion war dabei die Zeit $t = 0$ und dem Blutspiegel y^* das Symbol a der Ausgangskonzentration bei Gleichverteilung von D-Milchsäure im Blut ($y^* = a$) zuzuordnen. In Anbetracht des erneuten Auftretens dieses komplexen, exponentiellen Konzentrationsabfalles, auch nach 5 - 6-stündiger Dauerinfusion, läßt sich ausschließen, daß dieser ungewöhnliche Kurvenverlauf durch verzögerte Verteilungsvorgänge hervorgerufen wird. Beim Vergleich dieser Konzentrationsabnahme mit der nach Kurzzeitinfusion (s. Abb. 3 u. 5.) fällt auf, daß das komplexe Kurvenbild der Elimination von D-Milchsäure hier im Anfangsteil nicht durch Verteilungsvorgänge überlagert wird. Damit erscheint diese Versuchstechnik für eine exakte Bestimmung eliminationskinetischer Parameter besonders geeignet. Sie kann jedoch nicht dazu herangezogen werden, das Verteilungsgeschehen von D-Milchsäure im Wiederkäuerorganismus unmittelbar darzustellen.

3.2. D-Milchsäure-Verteilung

Bisher wurden bei der Erörterung des Konzentrationsverlaufes von D-Milchsäure im Blut nach intravenöser Applikation nur jene Kurvenabschnitte erörtert, die nach Abschluß der initialen Verteilungsvorgänge vorliegen. Es erscheint deshalb angebracht, sich im folgenden auch den verteilungsbedingten Konzentrationsänderungen zuzuwenden.

3.2.1. Verteilungsbedingte Einflüsse auf den Konzentrationsverlauf von D-Milchsäure im Blut

Bei der Erörterung der Verteilung von infundierter D-Milchsäure ist es zweckmäßig, zunächst von einem bestimmten Verteilungsvolumen als Ganzes auszugehen. Dieses soll das intravasale Kompartiment (Blut) sowie alle diejenigen

extravasalen Kompartimente umfassen, zwischen denen die D-Milchsäureverteilung in Richtung auf ein Diffusionsgleichgewicht unterschiedlich rasch abläuft. Jeweils der erste, für wenige Minuten nicht lineare Kurvenabschnitt nach Kurzzeitinfusion (s. Abb. 3) gibt einen Hinweis auf derartige Verteilungsvorgänge. Hier entstand durch Überlagerung der reinen Eliminationsfunktion mit Verteilungsvorgängen ein mehrfach zusammengesetzter exponentieller Kurvenverlauf⁺.

Aus dieser zusammengesetzten e-Funktion können durch "graphisches Abschälen"⁺⁺ bis zu drei Teilfunktionen abgeleitet werden. Dazu muß jedoch der betreffende Kurvenabschnitt in seinem Verlauf durch eine enge Meßpunktfolge eindeutig bestimmbar sein, was bei den vorliegenden Versuchen nicht der Fall war. Die weiteren Erörterungen der D-Milchsäure-Verteilung stützen sich deshalb auf ein vereinfachtes aber sicheres Modell mit einem intravasalen und mindestens einem extravasalen Kompartiment.

3.2.2. Verteilungsquotient, Verteilungsvolumen und Distributionskoeffizient von D-Milchsäure

Während der Gleichgewichtseinstellung zwischen Blut und Gewebe findet bereits eine Eliminierung von D-Milchsäure statt, auch wenn dies an den aktuellen Meßwerten im Blut noch nicht erkennbar ist. Extrapoliert man deshalb von der Eliminierungsfunktion auf die Ordinate, so erhält man die bereits vorher genannte fiktive Anfangskonzentration a . Sie entspricht derjenigen Konzentration des intravasalen Kompartimentes, die vorherrschen würde, wenn sich die infundierte D-Milchsäure bereits zur Zeit $t = 0$, also noch ohne jegliche Elimination, im Verteilungsgleichgewicht

⁺ $y = y_1 + y_2 + \dots + y_i$; $i - 1$ = Anzahl der unterschiedlichen Verteilungsvorgänge

⁺⁺ graphische Extrapolations- und Subtraktionsmethode nach SOLOMON (1960)

zwischen allen in Frage kommenden Kompartimenten befände ($a = a_1$). Mit diesem Wert a_1 ergibt sich auch die Möglichkeit, die im gesamten extravasalen Kompartiment herrschende Konzentration a_2 zu ermitteln:

Der Verteilungsquotient a_2/a_1 kennzeichnet die anteilmäßige Verteilung zwischen den beiden Kompartimenten. Seine Berechnung aus allen Kurzzeit-Infusionsversuchen ergab einheitlich, daß die Konzentration im extravasalen Kompartiment zu jeder Zeit kleiner war, als die im intravasalen Kompartiment. Die minimale und die maximale extravasale Konzentration kann je nach D-Milchsäure-Dosierung 5 bzw. 30 % der Blutkonzentration betragen. Die Abhängigkeit des Verteilungsquotienten von der jeweils infundierten Dosis läßt sich durch die in Abbildung 7 wiedergegebene Funktion eindeutig beschreiben. Gesteigerte Dosen von D-Milchsäure bewirken demnach bei Ziege, Schaf und Rind gleichermaßen einen größeren Verteilungsquotienten, d. h. eine gesteigerte Verteilung ins extravasale Kompartiment. Der Anstieg dieser extravasalen D-Milchsäure-Konzentration erfolgt dabei nur bis zu einer Dosis von etwa 150 mg/kg G äußerst rasch, wie der anfänglich steile Kurvenverlauf in Abbildung 7 zeigt. Bei einer weiteren Dosissteigerung entspricht der Kurvenverlauf immer mehr einer Sättigungskurve, bei der der Anstieg des Verteilungsquotienten geringer wird und sich letztlich einem Maximum nähert. Das Bestehen eines Diffusionsgleichgewichtes für D-Milchsäure zwischen allen möglichen Kompartimenten der Verteilung ist demnach nicht gleichbedeutend mit einer überall herrschenden Konzentrationsgleichheit. Für die physiologische Beurteilung der Verteilung von D-Milchsäure im Wiederkäuerorganismus sind die berechneten Größen des Verteilungsvolumens und des Distributionskoeffizienten besser geeignet. In Tabelle 4 sind diese für Ziege, Schaf und Rind zusammen mit den jeweiligen Versuchsbedingungen als Mittelwerte aufgeführt. Da diese Volumina je nach Bestimmungsmethode nicht signifikant verschieden wa-

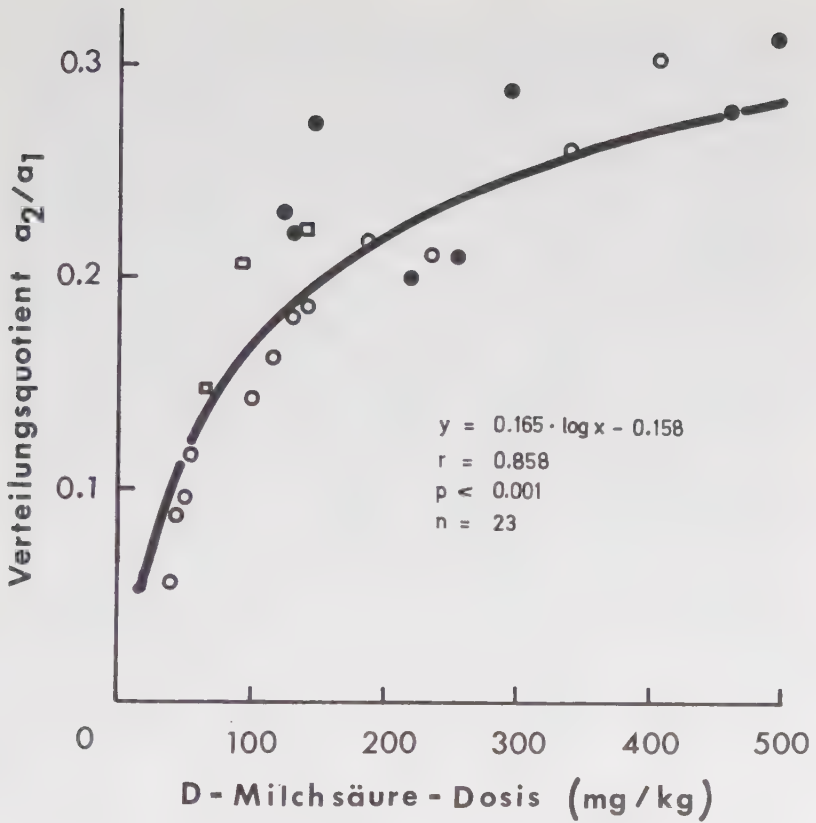


Abb. 7 Verteilungsquotient (a_2/a_1) von D-Milchsäure in Abhängigkeit von der Dosis nach Kurzzeitinfusion bei Ziege (●), Schaf (○) und Rind (□)

a_2 = extravasales Kompartiment
 a_1 = intravasales Kompartiment

Tabelle 4

Verteilungsraum (V) und Distributionskoeffizient (Δ) von D-Milchsäure (ermittelt über den Konzentrationsverlauf von D-Milchsäure im Blut bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen)

Versuchs- bedingungen	<u>Ziegen</u>		<u>Schafe</u>		<u>Rind</u>	
	V(l)	Δ (l/kg)	V(l)	Δ (l/kg)	V(l)	Δ (l/kg)
nach Kurz- zeitinfusion	9.4 $\pm$ 0.9 n=8	0.306 $\pm$ 0.032	16.7 $\pm$ 5.1 n=12	0.214 $\pm$ 0.069	137.7 $\pm$ 21.5 n=3	0.240 $\pm$ 0.037
nach Dauer- infusion	10.5 $\pm$ 1.7 n=7	0.335 $\pm$ 0.052	20.5 $\pm$ 6.5 n=8	0.268 $\pm$ 0.085	-	-
im Fließ- gleichgewicht	9.6 $\pm$ 1.2 n=7	0.305 $\pm$ 0.040	-	-	-	-
Mittelwert aus allen Versuchen						
	9.8 $\pm$ 1.3 n=22	0.315 $\pm$ 0.041	18.2 $\pm$ 5.8 n=20	0.235 $\pm$ 0.078	137.7 $\pm$ 21.5 n=3	0.240 $\pm$ 0.037

n = Anzahl der Versuche; - = nicht bestimmt

ren, ließen sie sich bei Ziege und Schaf zu je einem Mittelwert zusammenfassen. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die Verteilungsvolumina bei allen 3 Tierarten recht gut mit der Größe des Extrazellulär-Raumes von 25 - 30 % des Körpergewichtes übereinstimmen. Der Unterschied im Anteil des Verteilungsvolumens an der Körpermasse bei der Ziege (31.5 %) gegenüber Schaf (23.5 %) und Rind (24 %) braucht dabei nicht artspezifisch zu sein, sondern kann mit einem unterschiedlichen Fettanteil an der Körpermasse in Zusammenhang stehen.

Für eine richtige Einordnung dieser Daten ist zu berücksichtigen, daß Verteilungsraum bzw. Distributionskoeffizient keine realen Größen darstellen, sondern reine Rechengrößen für die indirekt vergleichende Beurteilung. Sie können deshalb nur eine Vorstellung darüber vermitteln, wie groß der Raum für eine D-Milchsäureverteilung im Wiederkäuerorganismus anzugeben wäre, wenn in allen Kompartimenten die gleiche Konzentration angenommen werden dürfte. Diese "fiktiven" Größen haben ihre Bedeutung u. a. bei mathematischen Kompartimentanalysen, beim relativen Vergleich der Verteilung ähnlicher Verbindungen oder beim tierartlichen Vergleich.

3.3. Kinetik der Elimination von D-Milchsäure

3.3.1. Berechnung aus dem Konzentrationsverlauf nach Kurzzeit- bzw. Dauerinfusion

Wie bereits erwähnt, zeigt der Konzentrationsverlauf von D-Milchsäure im Blut von Wiederkäuern nach den initialen Verteilungsvorgängen eine Besonderheit: Unabhängig von der jeweiligen Applikationsart traten nacheinander bis zu 4 verschiedene Eliminierungsfunktionen auf. Ihr Zustandekommen durch infusionsbedingte Änderungen des zellulären und/oder Plasmaanteiles ließ sich ausschließen, da der venöse Hämatokrit (Mikrohämatokritbestimmung) während der angesetzten Versuchszeit keine signifikanten Abweichungen

von den jeweils physiologischen Ausgangswerten ergab. Allen Eliminierungsfunktionen war dagegen gemeinsam, daß sie sich bestimmten Konzentrationsbereichen von D-Milchsäure im Blut zuordnen ließen. Die bei Ziegen erhaltenen Konzentrationsbereiche sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Die entsprechenden von Schaf und Rind gewonnenen Werte wiesen untereinander eine so weitgehende Übereinstimmung auf, daß sie gemeinsam in Tabelle 6 zusammengefaßt sind.

Aus beiden Tabellen ergibt sich zunächst, daß bei fallendem Konzentrationsbereich die Eliminierungsgeschwindigkeit für D-Milchsäure steigt bzw. die entsprechende biologische Halbwertszeit deutlich abnimmt. Wie aus den geringen Streuungen der Werte für $T_{1/2}$ und k hervorgeht, besteht innerhalb der zusammengefaßten, identischen Konzentrationsbereiche aus verschiedenen Versuchen eine gute Übereinstimmung. Darüberhinaus zeigt ein Vergleich beider Tabellen, daß zwischen Ziegen einerseits, sowie Schaf und Rind andererseits nur für den niedrigsten, gemeinsamen Konzentrationsbereich von ca. 10 - 100 mg/l hinsichtlich der aufgeführten Daten Übereinstimmung besteht. Alle weiteren Konzentrationsbereiche sowie deren eliminationskinetische Daten weisen dagegen auffällige tierartliche Unterschiede auf. Letztere treten nach Übertragung der Werte in halblogarithmisch dargestellten Mittelwertskurven (s. Abb. 8) besonders deutlich zutage. Danach erfolgt bei Ziegen im Bereich gleicher Blutkonzentrationen eine wesentlich raschere Eliminierung. Wurde als Eliminierungszeit die bis zur Abnahme auf 15 mg/l⁺ benötigte Zeit zur Ausgangskonzentration in Beziehung gesetzt, so ergaben sich die in Abbildung 9 dargestellten, berechneten Regressionskurven. Diese weisen ebenfalls bis zu einer Ausgangskonzentration von etwa 100 mg/l keinen deutlichen Unterschied

⁺ Dieser Wert ergab sich aus Abb. 7 als niedrigste für Ziege, Schaf und Rind gemeinsame, gemessene Endkonzentration.

Tabelle 5

Kinetische Parameter der D-Milchsäure-Elimination aus dem Blut von Ziegen^{a)} bei abfallender D-Milchsäurekonzentration

Konzentrationsbereich (mg/l)			Halbwertszeit (min)	Eliminationskonstante k (min ⁻¹)	n ^{b)}
909	-	220	80	0.0087	8
± 295	±	52	± 13	± 0.0015	
303	-	89	48	0.0146	11
± 117	±	38	± 6	± 0.0020	
115	-	15	26	0.0273	9
± 39	±	11	± 2	± 0.0027	

a) 8 Versuche an 4 Tieren mit Kurzzeitinfusion
4 Versuche an 2 Tieren nach Absetzen einer Dauerinfusion

b) n = Anzahl identischer Konzentrationsbereiche

Tabelle 6

Kinetische Parameter der D-Milchsäure-Elimination aus dem Blut von Schafen^{a)} und einem Rind^{b)} bei abfallender D-Milchsäure-Konzentration

Konzentrations- bereich (mg/l)	Halbwertszeit $T_{1/2}$ (min)	Eliminations- konstante k (min^{-1})	$n^c)$
911 - 410 ± 266 ± 128	164 ± 27	0.00432 ± 0.00070	8
474 - 154 ± 107 ± 23	122 ± 19	0.0058 ± 0.0009	7
252 - 58 ± 112 ± 32	58 ± 14	0.0127 ± 0.0030	17
64 - 12 ± 24 ± 7	31 ± 6	0.0231 ± 0.0040	8

- a) 12 Versuche an 3 Tieren mit Kurzzeitinfusion
8 Versuche an 2 Tieren nach Absetzen einer Dauerinf.
- b) 3 Versuche an 1 Tier mit Kurzzeitinfusion
- c) n = Anzahl identischer Konzentrationsbereiche

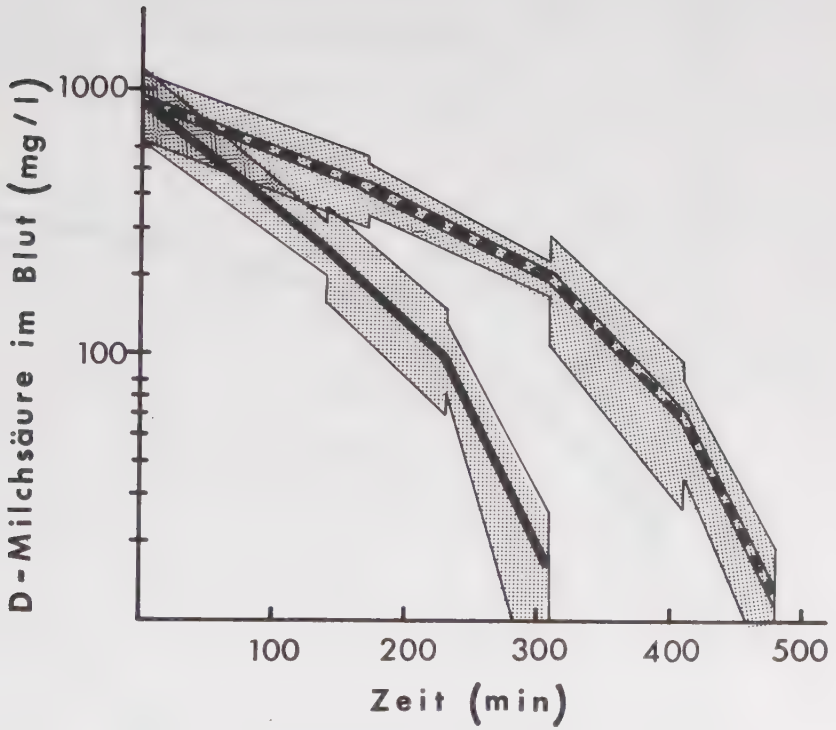


Abb. 8 Mittelwertskurven der Elimination von D-Milchsäure bei Ziege (—), sowie Schaf und Rind (---) nach Kurzzeit- und Dauerinfusion von DL-Milchsäure (nach Tabelle 2 und 3)

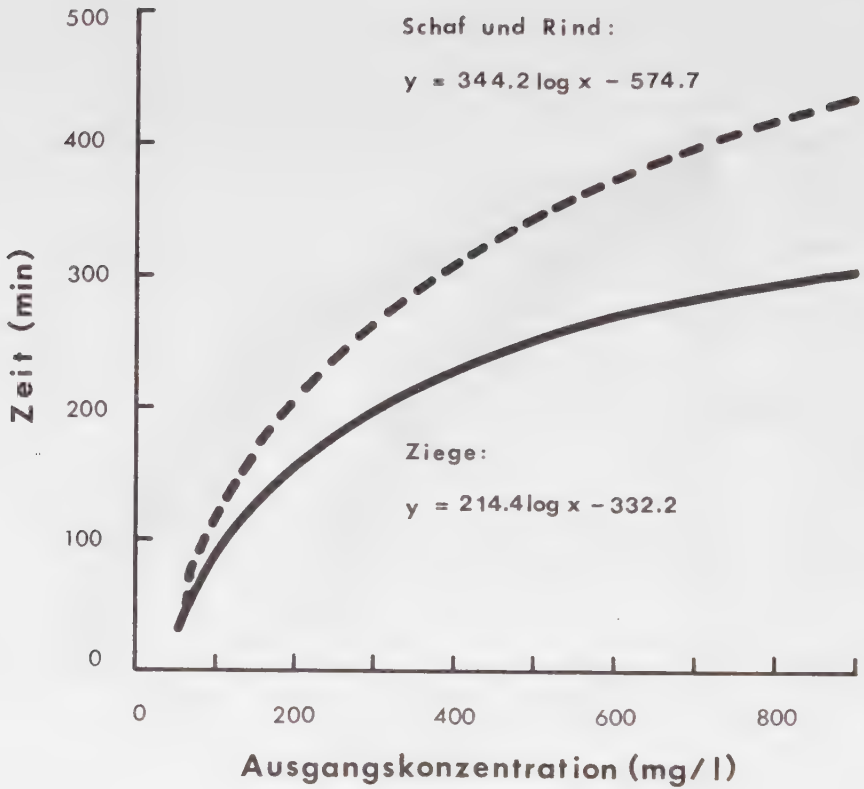


Abb. 9 Beziehung zwischen der Konzentration von D-Milchsäure im Blut und der zur Abnahme auf eine Grenzkonzentration von 15 mg/l benötigten Zeit (berechnet nach den in Tab. 2 und 3 sowie in Abb. 6 dargestellten Versuchen)

Ziege (—): $y = 214.4 \log x - 332.2$

Schaf u. Rind (---): $y = 344.2 \log x - 574.7$

von Ziege gegenüber Schaf und Rind auf. Bei Konzentrationen um 500 bzw. 900 mg/l benötigten letztere jedoch rund 25 % bzw. 35 % mehr Zeit, um D-Milchsäure vollständig aus der Zirkulation zu beseitigen.

3.3.2. Eliminationskinetik im künstlichen Fließgleichgewicht

Auf Grund der eingangs getroffenen Feststellung, daß im Organismus von Ziege, Schaf und Rind kein meßbarer D-Milchsäure-Pool existiert, konnte die Kinetik der Elimination zunächst anhand der Konzentrationsabnahme von D-Milchsäure dargestellt werden. Diese Befunde reichen allerdings für eine quantitativ verlässliche Aussage nicht aus, weil es dazu einer zusätzlichen genauen Kompartiment-Analyse bedurft hätte, die in Anbetracht der komplizierten Eliminationskinetik nur mit erheblichen Aufwendungen (z.B. Ganzkörper-Analysen) erreichbar war. Demzufolge schien für die Darstellung einer quantitativen Eliminationskinetik, ähnlich wie bei der Verteilungskinetik, ein vereinfachtes Kompartiment-Modell geboten. Die Stoffwechsel-Kinetik eines 1-Kompartiment-Systems z. B. konnte dann mit großer Zuverlässigkeit im Zustand des Fließgleichgewichtes von D-Milchsäure im Wiederkäuerorganismus gemessen werden. Um nun im "steady state" zugleich quantitative Befunde über die Metabolisierung und Ausscheidung von D-Milchsäure zu erhalten, wurde bei Ziegen über intravenöse Dauerinfusion ^{14}C -U-D-Milchsäure zugeführt und der Verlauf der spezifischen Aktivität im Blut (s. Abb. 5), im Harn und in der Expirationsluft (s. Abb. 13) verfolgt. Die unter derartigen Versuchsbedingungen ermittelten Eliminationsparameter der Ziegen sind in Tabelle 7 dargestellt. Entsprechende Daten vom Schaf, in Tabelle 8, wurden dagegen ohne den Einsatz von Isotopen ermittelt. Dies schien möglich, weil sich bei Ziegen eine gute Übereinstimmung zwischen den über "Isotopen-Verdünnung" ermittelten und den bereits bekannten Eliminationsparametern

Tabelle 7

Kinetik der Elimination von D-Milchsäure im künstlichen Fließgleichgewicht bei der Ziege

Transfer- rate Tf	a) D-Milchsäure- Spiegel y^*	Pool Pl	Transfer- konstante k	b) Transfer- zeit $\frac{1}{k}$	b) Halbwerts- zeit $T_{\frac{1}{2}}$
(mg/kg G·min)	(mg/l)	(mg/kg G)	(min ⁻¹)	(min)	(min)
0.84	150	56	0.0150	67	46
1.20	379	103	0.0116	86	60
1.50	492	147	0.0102	98	68
1.70	652	183	0.0093	107	75
2.00	695	222	0.0090	111	77

a) im künstlichen D-Milchsäure-Fließgleichgewicht ist Transferrate = Dosisstrom

b) berechnet aus dem Abfall der spezifischen Aktivität im Blut (s. Abb. 5)

Tabelle 8

Kinetik der Elimination von D-Milchsäure im künstlichen Fließgleichgewicht beim Schaf

Transfer- rate Tf	a) D-Milchsäure- Spiegel y*	Pool Pl	Transfer- konstante k	b) Transfer- zeit $\frac{1}{k}$	b) Halbwerts- zeit $\frac{T_1}{2}$
(mg/kg G·min)	(mg/l)	(mg/kg G)	(min ⁻¹)	(min)	(min)
0.44	190	30	0.0149	67	46
0.47	215	33	0.0142	70	49
0.50	230	39	0.0129	78	54
1.80	1275	383	0.0042	213	147
2.10	1470	500	0.0042	238	165

a) im künstlichen D-Milchsäure-Fließgewicht ist Transferate = Dosisstrom

b) berechnet aus der Konzentrationsabnahme von D-Milchsäure nach Absetzen der Dauerinfusion (s. Abb. 5)

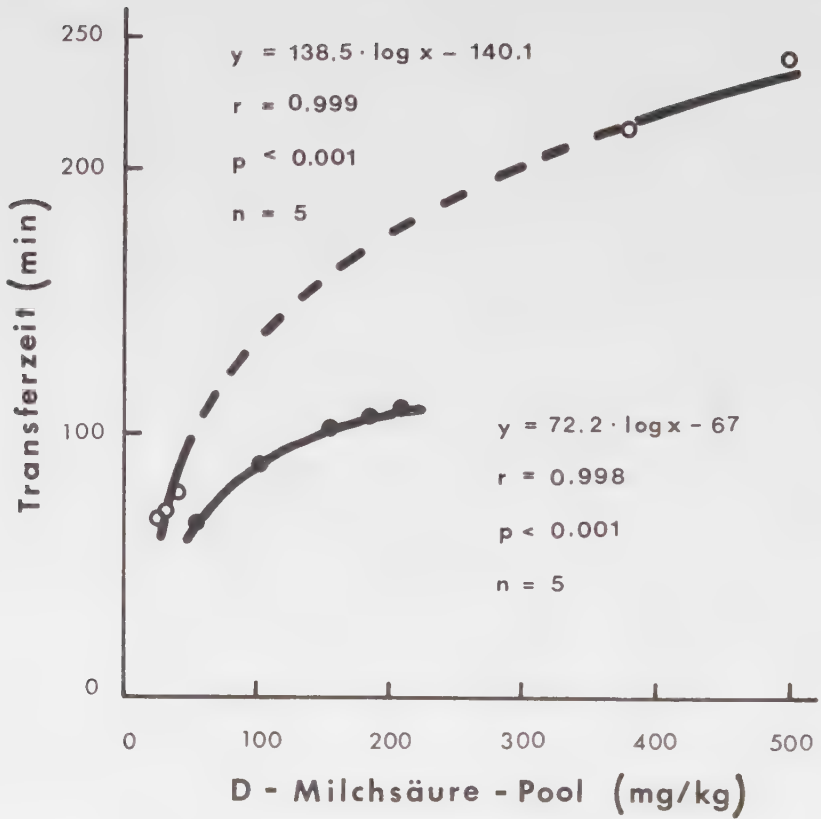


Abb. 10 Beziehung zwischen Poolgröße und Transferzeit von D-Milchsäure im künstlichen Fließgleichgewicht bei 2 Ziegen (●) und 2 Schafen (○)

zeigte. Wie in den Tabellen 7 und 8 festgehalten, wurde der Dosisstrom von D-Milchsäure bei Ziege und Schaf im Bereich von 0.84 - 2.0 bzw. 0.44 - 2.1 mg/kg · min variiert, um die Auswirkung auf die Eliminationskinetik sowie auf Blutspiegel und Pool festzustellen. Die jeweilige Durchsatzrate der D-Milchsäure war dabei vorgegeben, da im künstlichen Fließgleichgewicht der Transfer dem Dosisstrom entspricht.

Beiden Tierarten war in diesen Experimenten gemeinsam, daß bei zunehmender Infusionsrate das Milchsäure-Plateau bzw. der Pool anstieg, die Transferkonstante abnahm und dementsprechend die Transferzeit zunahm. Berechnet man über den Distributionskoeffizient und die Gleichgewichtskonzentration der D-Milchsäure im Blut den jeweiligen D-Milchsäure-Pool und korreliert diesen mit der zugehörigen Transferzeit, so ergeben sich für Ziege und Schaf zwei unterschiedliche, nicht-lineare Regressionskurven (s. Abb. 10). Diesen liegen zwar recht differente Pool-Größen zugrunde, doch treten die charakteristischen Unterschiede des Verlaufes deutlich hervor. Demnach unterscheiden sich die Transferzeiten bei niedrigem D-Milchsäure-Pool (≤ 40 mg/kg G) nicht oder nur unbedeutend. Erst bei steigender Poolgröße werden die Unterschiede bei der Elimination von D-Milchsäure deutlicher. So benötigen die Schafe bei Poolgrößen von 100 bzw. 200 mg/kg G Transferzeiten, die gegenüber denjenigen von Ziegen um 35 und 40 % höher lagen.

3.4. Mechanismen der Elimination von D-Milchsäure

Wurde bisher vorwiegend die Kinetik der Verteilung und Elimination von D-Milchsäure behandelt, so werden in den folgenden Abschnitten jene Mechanismen erörtert, die an der Elimination beteiligt sind. Die wichtigsten Eliminierungsprozesse können in einer biochemischen Umwandlung in Verbindungen gesehen werden, die nicht mehr als Milchsäure nachweisbar sind und ausgeschieden werden können (z.B. Oxidation zu CO_2 und Expiration) sowie in einer direkten

Ausscheidung der unveränderten Milchsäure in Sekreten und/oder Exkreten. In den nachfolgenden Abschnitten wird insbesondere versucht, die Ausscheidung von D-Milchsäure über den Harn und über die Atmung nach Oxidation zu CO_2 quantitativ zu beschreiben.

3.4.1. Ausscheidung von D-Milchsäure im Harn

Bei allen Infusionsversuchen wurde über die gesamte Versuchszeit Spontan-Harn gesammelt und analytisch aufgearbeitet. So wurden bei Kurzzeitinfusionen die ausgeschiedenen Mengen beider Milchsäure-Isomeren bis zu 6 Stunden nach Applikation quantitativ erfaßt. Die 6-stündige Sammelperiode der Harnfraktionen erwies sich dabei als ausreichend, denn bei vereinzelt länger angesetzter Versuchsdauer von 8 - 10 Stunden traten nur noch unbedeutende Milchsäure-Mengen ($< 0.1\%$ der 6-Stunden-Ausscheidung) in die später erhaltenen Harnfraktionen über. Betrachtet man die 6-Stunden-Werte demnach als Gesamtausscheidung ($\approx 100\%$) der Milchsäure, so waren bedeutende Anteile davon bereits erheblich früher ausgeschieden: Bei Ziege, Schaf und Rind erschienen nach rund einer Stunde 75, 40 und 70 %, nach zwei Stunden 90, 60 und 85 % sowie nach drei Stunden 95, 80 und 95 % der insgesamt ausgeschiedenen D-Milchsäure-Menge im Harn. Diesem Ergebnis zufolge scheinen Ziegen eine bestimmte D-Milchsäure-Menge am schnellsten, Schafe dagegen am langsamsten über den Harn zu eliminieren. Mit dieser Hauptausscheidung von Milchsäure im Harn während der ersten 2 Stunden nach Applikation ging eine auffällige Erniedrigung des pH-Wertes in den entsprechenden Harnfraktionen einher. So erfolgte beim Schaf nach intravenösen Belastungen mit 130 - 406 mg D-Milchsäure pro kg G innerhalb der ersten beiden Stunden ein kurzfristiger Anstieg der Acidität im Harn von pH 8.6 auf pH 5.2. Dabei war jedoch die deutlichste pH-Erniedrigung nicht immer mit den höchsten D-Milchsäure-Konzentrationen in der jeweiligen Harnfraktion korreliert.

Bei einem Vergleich der relativen Ausscheidungswerte beider Isomeren (in % der Dosis) ergaben sich nicht unerwartet deutliche quantitative Unterschiede. Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, erfolgte bei Ziege, Schaf und Rind einheitlich eine wesentlich stärkere Ausscheidung der D-Milchsäure: Sie betrug bei einer Dosis von 200 mg/kg G für D 16 und für L 3 %, bei 400 mg/kg G 31 bzw. 6 % der Dosis, d. h. vom D-Isomer wird bei gleicher Belastung rund das 3.5-fache des L-Isomers ausgeschieden. Bei beiden Isomeren scheint jedoch die prozentuale Ausscheidung erst nach Überschreiten einer bestimmten "Dosischwelle" zunächst rasch anzusteigen⁺, um dann anschließend entsprechend einer linearen Beziehung zur Dosis zu verlaufen. So lag die D-Milchsäure-Ausscheidung unmittelbar nach den niedrigsten Belastungen von ≤ 50 mg/kg G bei ≤ 2 %. Innerhalb des engen Dosisbereiches von 50 - 150 mg/kg stieg sie bis auf 18 % der Dosis an, um dann linear mit der Dosis zu steigen. Dieses Bild trat weniger deutlich beim L-Isomer auf. Hier scheint die Dosischwelle bei 100 - 150 mg/kg mit einer Ausscheidung von ≤ 1 % zu liegen. In einem Bereich von 150 - 250 mg/kg erhöhte sich die Ausscheidung rasch auf 4 - 5 % der Dosis. Diese Beziehung zwischen Dosis und Ausscheidung ließ auf bestimmte "Schwellenkonzentrationen" für D- und L-Milchsäure im Blut schließen, deren Überschreitung eine unvollständige Rückresorption in den Nierentubuli zur Folge hat. Für D-Milchsäure ergab sich zur Schwellendosis von ca. 50 mg/kg mit Hilfe der in Abbildung 4 dargestellten Beziehungen näherungsweise eine Schwellenkonzentration von ca. 300 mg/l. Für eine direkte und genauere Ermittlung der Nierenschwelle von D-Milchsäure war es jedoch erforderlich, den Blutspiegel bei verschiedenen Konzentrationen längere Zeit konstant zu halten. Mehrere Harnfraktionen während dieses künstlichen Fließgleichgewichtes erlaubten es dann, die zugeordnete

⁺Gestrichelter Kurvenverlauf in Abbildung 11

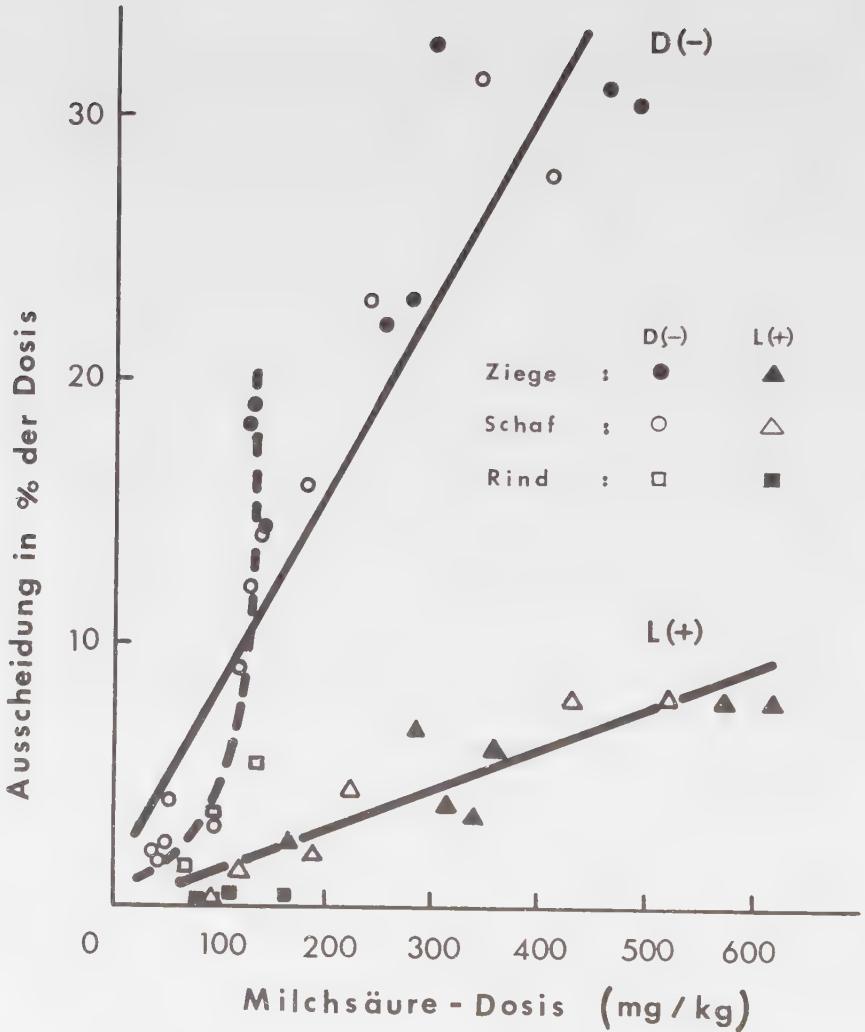


Abb. 11 Beziehungen zwischen der Dosis von D- und L-Milchsäure und der prozentualen Ausscheidung im Harn bis zu 6 Stunden nach Kurzzeitinfusion

(--- nicht berechneter Kurvenverlauf für Dosierungen $D < 150 \text{ mg/kg G}$)

$$D(-): y = 1.17 - 0.07x; r = 0.903; p < 0.001; n = 23$$

$$L(+): y = 0.02x - 0.37; r = 0.896; p < 0.001; n = 16$$

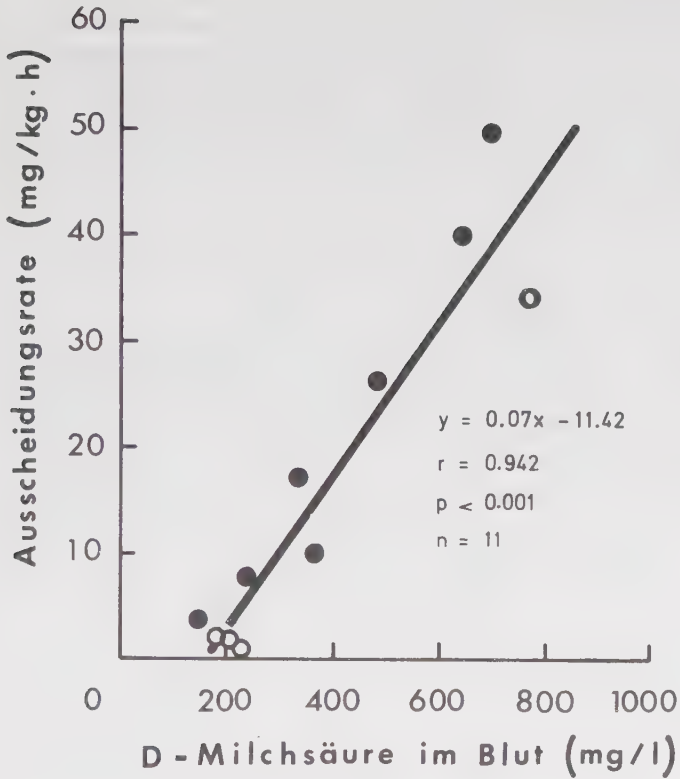


Abb. 12 Beziehung zwischen der Konzentration von D-Milchsäure im künstlichen Fließgleichgewicht (y^*) und der Ausscheidungsrate über die Niere bei Ziege (●) und Schaf (○)
Nierenschwelle ($y = 0$): 163 mg/l

Ausscheidungsrate zu ermitteln. Korreliert man die durch Dauerinfusion bei Ziege und Schaf konstant gehaltenen Blutspiegel mit den zugeordneten Ausscheidungsraten, so erhält man wie in Abbildung 12 ersichtlich eine enge lineare Beziehung. Diese liefert unter der Bedingung $y = 0$ einen Blutspiegel von 163 mg/l als Nierenschwelle für D-Milchsäure im venösen Blut.

3.4.2. Oxidation von D-Milchsäure zu CO_2

3.4.2.1. $^{14}\text{CO}_2$ - Exhalation bei Ziegen

Bei allen Infusionsversuchen mit ^{14}C -D-Milchsäure wurde über eine Versuchsdauer von 6 Stunden außer in Blut und Harn ^{14}C -Aktivität auch in der Expirationsluft quantitativ erfaßt. Diese radiometrischen Messungen von exhaliertem $^{14}\text{CO}_2$ sollten dabei insbesondere zeigen, welchen Anteil die Oxidation bei der Elimination von D-Milchsäure aus dem Wiederkäuerorganismus ausmacht.

Bereits wenige Minuten nach Applikation der radioaktiven Infusionslösungen konnte $^{14}\text{CO}_2$ in der Expirationsluft gemessen werden. So waren z. B. bei 3 Kurzzeitinfusionsversuchen 5 Minuten nach Beendigung der Infusion 1 - 1.5 % der insgesamt gemessenen Aktivität ($\mu\text{Ci}/6 \text{ h}$) erschienen. Trägt man den zeitlichen Verlauf der Aktivitätsausscheidung graphisch auf, so weisen die Ausscheidungskurven der standardisierten spezifischen $^{14}\text{CO}_2$ -Aktivität jeweils ein Maximum auf, das mit steigender D-Milchsäure-Dosis niedriger und gleichzeitig auf einen späteren Zeitpunkt (240, 290, 320 min) verschoben wird (s. Abb. 13). Bei zunehmender D-Milchsäure-Belastung über einen Bereich von 147 - 493 mg/kg G nahm demnach die Anfangsrate der Oxidation ab. Dadurch wurde die Oxidation des D-Isomers insgesamt deutlich verzögert. In Tabelle 9 ist dieser Befund zahlenmäßig festgehalten. Eine Dosissteigerung um 100 bzw. 235 % bewirkte demnach eine Zunahme der absoluten Oxidationswerte ($\mu\text{Mol L-C/kg}\cdot 6 \text{ h}$) um 60 bzw. 95 % sowie eine Abnahme der relativen Oxidationswerte (% der Dosis) um rund

20 bzw. 40 %.

Nach den Blutwerten dieser 3 Versuche war davon auszugehen, daß jeweils 6 Stunden nach Kurzzeitinfusion das gesamte D-Isomer aus dem Blut eliminiert war. Bei den Versuchen mit erhöhter Dosis von D-Milchsäure und verzögerter Oxidation zu CO_2 könnte demnach ein größerer Teil der Dosis bereits mit dem Harn ausgeschieden oder in andere Körperbestandteile übergeführt worden sein.

Um den Zusammenhang zwischen Dosis und Oxidationsrate besser definieren zu können, wurde der Zustand des Fließgleichgewichtes gewählt, also Dauerinfusion ^{14}C -markierter Milchsäure bei Ziegen unter gleichzeitiger Exhalationsmessung von $^{14}\text{CO}_2$ durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 10 wiedergegeben. Für eine raschere Gleichgewichtseinstellung war auch hier wieder eine Startdosis erforderlich. Die Variationen des Dosisstromes von 28 auf maximal 67 $\mu\text{Mol L-C/kg G} \cdot \text{min}$ entsprachen einer Dosissteigerung um das 2.4-fache und hatten Blutspiegel zur Folge, die von 5.0 mMol L-C/l auf einen 4.6-fach höheren Wert stiegen. Bei einer Erhöhung des Dosisstromes von 28 auf 41 $\mu\text{Mol L-C/kg} \cdot \text{min}$ nahmen die absoluten Oxidationswerte von 10 auf 18 $\mu\text{Mol L-C/kg} \cdot \text{min}$, also um rund 80 % zu. Bei weiterer Dosissteigerung bis 67 $\mu\text{Mol L-C/kg} \cdot \text{min}$ fiel die absolute Oxidationsrate schließlich wieder bis auf 13 $\mu\text{Mol L-C/kg} \cdot \text{min}$ ab.

Diesen Ergebnissen zufolge war die Oxidationsrate für D-Milchsäure bei zunehmender Belastung nur begrenzt steigerungsfähig. Bis zu einer Dosis von 40 $\mu\text{Mol Lactat-Kohlenstoff pro Minute und kg Körpergewicht}$ nahm der Anteil der Oxidation an der D-Milchsäure-Elimination auf den Maximalwert von 45 % des Dosisstromes zu. Darüber hinaus jedoch wurde dieser Anteil der Oxidationsrate auf niedrigere Werte reduziert. Interessanterweise trat die maximale Oxidationsrate erst bei einem Blutspiegel auf, der mit 240 mg/l deutlich über der als Nierenschwelle ermittelten D-Milchsäure-Konzentration von 163 mg/l lag. Die schnellste Oxi-

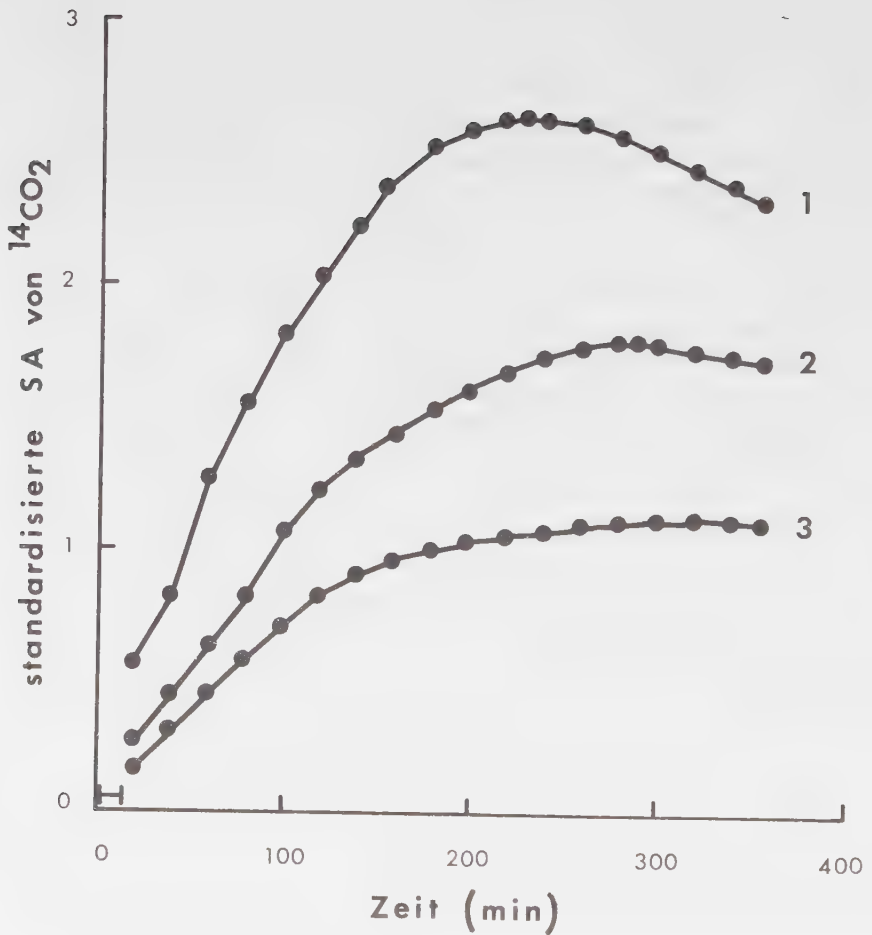


Abb. 13 Standardisierte spezifische ^{14}C -Aktivität (SA) in der Ausatemungsluft von Ziegen nach Kurzzeitinfusion von ^{14}C -U-D-Milchsäure (H = Infusionsdauer)

Dosis: 1) 147 mg/kg; 5.7 nCi/mg (B)
2) 296 mg/kg; 2.8 nCi/mg (D)
3) 493 mg/kg; 1.7 nCi/mg (B)

Tabelle 9

Oxidation von D-Lactat zu CO_2 innerhalb 6 Stunden nach Kurzzeit-Infusion bei Ziegen^a

Ziege	Dosis der D-Milchsäure ($\mu\text{Mol L-C/kg}$)	Oxidierte D-Milchsäure	
		($\mu\text{Mol L-C/kg} \cdot 6 \text{ h}$)	(% der Dosis)
B	4900	1850	38
D	9900	3000	30
B	16400	3600	22

^a Berechnung als D-Lactat-Kohlenstoff (L-C) aus der Oxidation von ^{14}C -U-D-Lactat zu $^{14}\text{CO}_2$

Tabelle 10

Oxidationsrate^a von D-Milchsäure im künstlichen Fließgleichgewicht bei Ziegen

D-Milchsäure-Belastung		D-Milchsäure-Blutspiegel		Oxidationsrate von D-Milchsäure	
Startdosis D ($\mu\text{Mol L-C/kg}$)	Dosisstrom D/t ($\mu\text{Mol L-C/min}\cdot\text{kg G}$)	($\mu\text{Mol L-C/l}$)	(mg/l)	($\mu\text{Mol L-C/kg G}\cdot\text{min}$)	(% D/t)
5067 (180) ^b	28 (180)	5000	150	10.0	35.7
5567 (167)	40 (110)	8000	240	18.0	45.0
5600 (167)	41 (130)	11430	343	18.0	44.0
6167 (227)	45 (90)	12630	379	16.2	36.0
10367 (90)	50 (73)	16400	492	14.9	29.8
10233 (90)	57 (80)	21730	652	14.1	24.7
9533 (97)	67 (67)	23170	695	13.2	19.7

^a Berechnung als D-Lactat-kohlenstoff (L-C) aus der Oxidation von $^{14}\text{C-U-D-Lactat}$ zu $^{14}\text{CO}_2$
 ()^b = Spezifische Aktivität ($\text{nCi}/\mu\text{Mol L-C}$)

dation von D-Milchsäure zu CO_2 wird damit erst erreicht, wenn bereits erhebliche Anteile des Substrates über die Niere eliminiert werden.

3.4.2.2. Oxidation von D-Milchsäure zu CO_2 in Gewebeschnitten in vitro

Um Aufschluß über die Beteiligung von einzelnen Organen an der Metabolisierung von D-Milchsäure zu erlangen, wurde in Ergänzung zu den Messungen in vivo eine vergleichende Untersuchung der Oxidation von D-Milchsäure in verschiedenen, metabolisch aktiven Organen (Herz, Niere, Leber) und im Pansenepithel mit entsprechenden Gewebeschnitten von Schaflämmern durchgeführt. Über die aus ^{14}C -Lactat freigesetzte und in KOH absorbierte $^{14}\text{CO}_2$ -Aktivität wurde der pro g Gewebetrockenmasse und Stunde oxidierte Lactat-Kohlenstoff (L-C) bestimmt.

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, zeigten die inkubierten Gewebeschnitte bei identischem Substratangebot je nach Organ teils erhebliche Unterschiede in der Oxidationskapazität. So wiesen einerseits Herz und Niere mit 130 bzw. 124 $\mu\text{Mol L-C/g TM} \cdot \text{h}$ und andererseits Leber und Pansenepithel mit 5.8 bzw. 7.4 $\mu\text{Mol L-C/g TM} \cdot \text{h}$ sehr ähnliche Oxidationsraten auf. Bei einem Vergleich untereinander machten die Oxidationsraten von Leber und Pansenepithel jedoch nur 4 - 5 % derjenigen von Herz und Niere aus.

Versucht man eine Lactat-C-Bilanz hinsichtlich der im Medium verschwundenen und in der KOH absorbierten ^{14}C -Aktivität, so zeigt sich bei Herz, Niere und Leber ein Fehlbetrag von 20 - 40 $\mu\text{Mol L-C/g TM} \cdot \text{h}$. Bei stichprobenartigen Verbrennungen von Gewebeschnitten der 3 Organe entsprach die im Gewebe retinierte ^{14}C -Aktivität in allen Fällen nahezu vollständig dem jeweiligen Fehlbetrag (s. Tab. 11). Dabei wurde nicht ermittelt, in welcher Form (z.B. D-Milchsäure und/oder Stoffwechselprodukte) diese ^{14}C -Aktivität im Gewebe nach Inkubation vorlag.

Eine Hochrechnung der Oxidationskapazität der einzelnen

Tabelle 11

Oxidation^{a)} von D-Milchsäure in Organen von Schaflämmern bei Inkubation von Gewebeschnitten in vitro

Geweibeschnitte	Organengewicht (g)	Gewebetrocken- masse TM (%)	D-Lactat-Kohlenstoff insgesamt verschwunden	im Gewebe retiniert	oxidiert
			$\mu\text{Mol L-C/g TM}\cdot\text{h}$		
Herz	118 ± 17 (12) ^{b)}	19.4 ± 2.3	158 ± 47 (5)	21 (2)	130 ± 58 (5)
Nieren- rinde	104 ± 9 (12)	20.2 ± 0.6	164 ± 42 (9)	36 ± 10 (5)	124 ± 38 (9)
Leber	436 ± 41 (12)	25.2 ± 1.6	36 ± 10 (7)	25 (2)	5.8 ± 1.5 (7)
Pansen- epithel	-	18.7 ± 1.9	-	-	7.4 ± 0.6 (5)

a) Berechnung als D-Lactat-Kohlenstoff (L-C) aus der Oxidation von ^{14}C -D-Lactat zu $^{14}\text{CO}_2$

b) (n) = Anzahl der Lämmer

- = nicht bestimmt

Organe aus den Werten der Tabelle 11 gelingt nur näherungsweise, denn man muß hierfür voraussetzen, daß die gesamte Organtrockenmasse in gleichem Maße an der Oxidation von D-Milchsäure beteiligt war. Unter dieser Annahme wiesen Herz, Niere und Leber eine Oxidationskapazität von 49.6, 43.4 und 10.1 $\mu\text{Mol L-C/min}$ auf. Die Masse des Pansenepithels wurde nicht ermittelt, so daß der Beitrag dieses Gewebes hier ebenso außer Ansatz blieb wie der von nicht in die Messung einbezogenen Organen. Von den vorgenannten Organen entfallen rund 90 % der Oxidationskapazität auf Niere und Herz.

3.4.3. Gluconeogenese aus D-Milchsäure

Versucht man anhand der Daten aus den Isotopen-markierten Infusionsversuchen bei Ziegen eine Bilanz des infundierten und wieder eliminierten D-Milchsäure-Kohlenstoffes zu erstellen, so erhält man aus den 3 Kurzzeitin-fusionsversuchen das in Tabelle 12 gezeigte Bild. Zwar war am Ende der Versuchszeit von 6 Stunden keine D-Milchsäure mehr im Blut nachweisbar, doch mußte ein wesentlicher Teil des Milchsäure-Kohlenstoffes noch in anderer Form im Wiederkäuerorganismus vorliegen.

Darüberhinaus wurde auch bei den Dauerinfusionsversuchen deutlich (s.Tab. 15), daß die beiden bisher erörterten Eliminationsmechanismen nicht ausreichen, dem jeweiligen Transfer von D-Lactat-Kohlenstoff zahlenmäßig zu entsprechen. Denn auch während des Fließgleichgewichtes von D-Milchsäure erschienen je nach Höhe des Transfers nur rund 50 - 70 % des stetig infundierten Lactat-Kohlenstoffes über Harn und Expirationsluft. Diese Ergebnisse ließen deshalb vermuten, daß ein erheblicher Teil des D-Milchsäure-Kohlenstoffes in Stoffwechselprodukte abfließt, deren Kohlenstoffgerüste zunächst einer anderen Verwendung als der Oxidation und der Ausscheidung im Harn zugeführt werden.

In einem zusätzlichen Dauerinfusionsexperiment (Ziege D)

Tabelle 12

Elimination von D-Lactat-Kohlenstoff (L-C) bei 2 Ziegen 6 Stunden nach Kurzzeitinfusion von ^{14}C -D-Milchsäure

D-Milchsäure- Belastung ($\mu\text{Mol L-C/kg}$)	oxidiertes D-Lactat-Kohlenstoff ($\mu\text{Mol L-C/kg} \cdot 6 \text{ h}$)	D-Milchsäure im Harn	unspezifischer L-C im Harn	Gesamt
4900	1850 (37.8) ^{c)}	700 (14.3)	170 (3.5)	2720 (55.5)
9900	3000 (30.3)	3200 (32.3)	800 (8.1)	7000 (70.7)
16400	3600 (22.0)	5000 (30.5)	500 (3.1)	9100 (55.5)

a) berechnet über spezifische ^{14}C -Aktivität in der Expirationsluft

b) ermittelt über die unspezifische ^{14}C -Aktivität im Harn

c) () = % der Dosis

wurde deshalb versucht, die ^{14}C -Aktivität in möglichen Stoffwechselprodukten wie z. B. Glucose, L-Milchsäure und Pyruvat zu erfassen. Der Versuch ist in Abbildung 14 dargestellt. Wie daraus ersichtlich ist, konnten bedeutende Anteile der infundierten ^{14}C -Aktivität in Glucose wiedergefunden werden. Die spezifische Glucoseaktivität (SA) stieg während der konstanten Zufuhr von ^{14}C -D-Milchsäure langsam an und erreichte zur Zeit des Fließgleichgewichtes der D-Milchsäure ein Plateau. In einem Wiederholungsversuch mit Ziege B ergab sich hinsichtlich der Konzentration von D-Milchsäure und Glucose bzw. der jeweiligen spezifischen Aktivität der gleiche Kurvenverlauf. Für den Plateaubereich von D-Milchsäure ließen sich mit Hilfe von präparativen Methoden die in Tabelle 13 aufgeführten Anteile der Gesamt- ^{14}C -Aktivität in Blutmetaboliten wiederfinden.

Die in Glucose wiedergefundene Aktivität erschien unerwartet hoch. Das Ergebnis ließ aber noch keinen Schluß darauf zu, welcher Anteil damit zur Biosyntheserate von Glucose beitragen wird. Die Ermittlung dieser Größe setzt voraus, daß der metabolische Glucosefluß (= Transfer) der Ziegen bei den gegebenen Bedingungen bekannt ist. Eigene Messungen des Glucose-Transfers konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Unter Zugrundelegung bereits bekannter Daten ließen sich jedoch für beide Ziegen die Gluconeogenese-Raten aus D-Lactat-Kohlenstoff näherungsweise ermitteln (s. Tab. 14). Danach stammen rund 12 bzw. 13 % des metabolischen Glucoseflusses aus D-Milchsäure. Das entspricht bei einem D-Lactat-Kohlenstoff-Transfer von 1.23 - 1.35 mmol/min einem Eintritt von 38 % D-Lactat-Kohlenstoff in den Glucose-Pool.

Im künstlichen Fließgleichgewicht von D-Milchsäure werden demnach deutlich mehr als 90 % des Flusses von D-Lactat-Kohlenstoff durch Gluconeogenese, Oxidation zu CO_2 und Ausscheidung über die Niere getragen. Ein geringer Teil des D-Lactat-Kohlenstoffes war auch in L-Milchsäure wie-

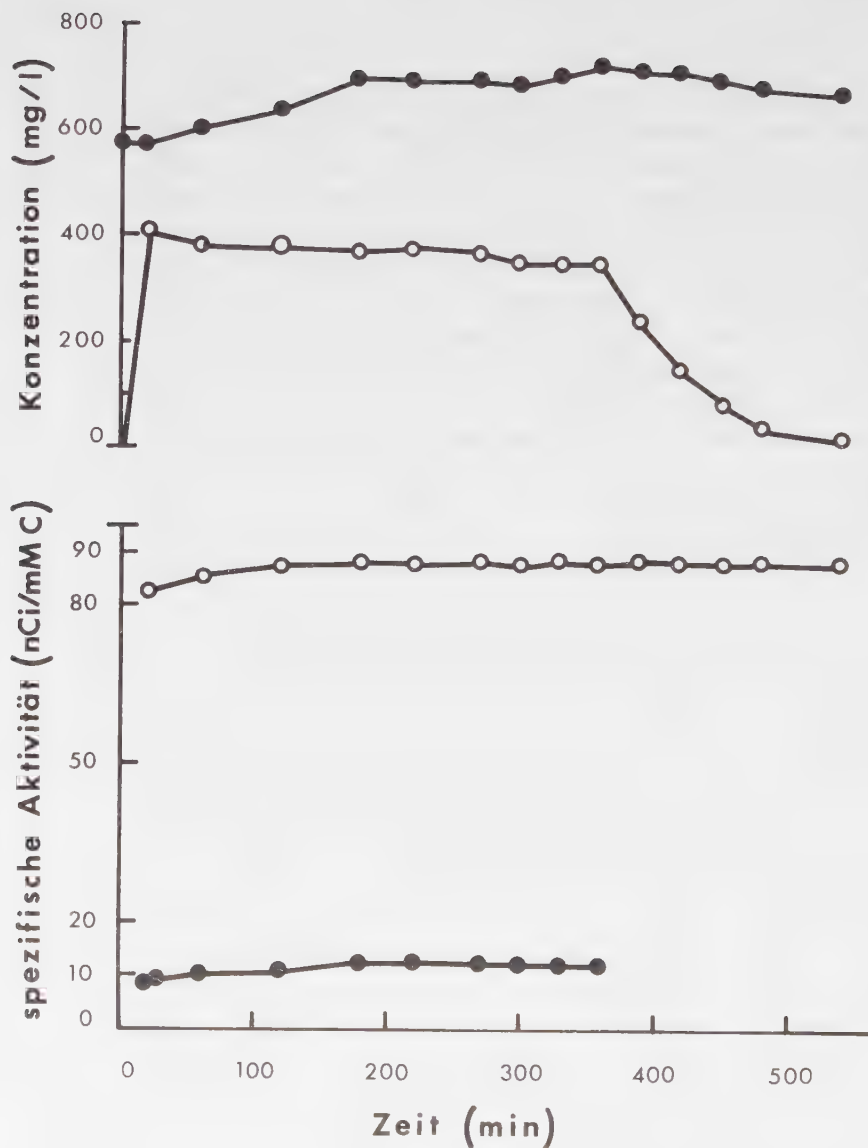


Abb. 14 Konzentration und spezifische Aktivität von D-Milchsäure (○) im Blut und Glucose (●) im Plasma einer Ziege (D) nach Dauerinfusion von ^{14}C -U-D-Milchsäure

Startdosis: 185 mg/kg; 6.8 nCi/mg

Dauerinfusion: 1.35 mg/kg·min; 2.7 nCi/mg

Tabelle 13

Verteilung der ^{14}C - Gesamtaktivität in Blutmetaboliten während des künstlichen Fließgleichgewichtes von D-Milchsäure bei Ziegen

Versuchsbedingungen	Ziege B	Ziege D
Startdosis: (mg/kg)	168.0	185.0
(nCi/mg)	5.5	6.8
Dosisstrom: (mg/kg·min)	1.23	1.35
(nCi/mg)	3.2	2.7
Blutmetabolite	Anteil (%) der Gesamtaktivität pro 1 Blut	
D-Milchsäure	74	62
Glucose	15.4	19.2
L-Milchsäure	3.2	-
Pyruvat	2.3	-
nicht identifiziert	5.1	18.8

- = nicht bestimmt

Tabelle 14

Berechnung der quantitativen Gluconeogenese aus D-Milchsäure
im künstlichen Fließgleichgewicht bei Ziegen

Versuchstiere	Ziege B	Ziege D
Transfer von D-Lactat-C: (mMol/min)	1.23	1.35
metabolischer Glucosefluß ^{a)} : (mMol/min)	0.64	0.64
Glucose aus D-Milchsäure ^{b)} : (mMol/min)	0.078	0.085
(% Glucosefluß)	12.2	13.3
Lactat-C-Einbau in Glucose ^{b)} : (mMol/min)	0.47	0.51
(% L-C-Transfer)	38.4	37.8

a) mit $9 \text{ mg/kg}^{0.75} \cdot \text{min}$ für die Ziege (ANNISON u. LINZELL, 1964)

b) berechnet nach der Methode von LENG, STEEL u. LUICK (1967)

Tabelle 15

Eliminationsraten von D-Lactat-Kohlenstoff (L-C) im künstlichen Fließgleichgewicht von D-Milchsäure bei 2 Ziegen

Transfer von Lactat	oxidiertes ^{a)} D-Lactat	D-Milchsäure im Harn	unspez. b) Verbindung im Harn	Glucono- genese	Gesamt
μMol L-C/kg G · min					
28	10.0 (35.7) ^{c)}	3.9 (13.9)	0.6 (2.1)	-	14.5 (51.7)
40	18.0 (45.0)	5.6 (14.0)	0.7 (1.8)	-	24.3 (60.8)
41	18.0 (44.0)	4.6 (11.3)	1.0 (2.5)	15.6 (38.3)	39.2 (95.6)
45	16.2 (36.0)	9.5 (21.1)	1.0 (2.2)	17.0 (37.8)	43.7 (97.1)
50	14.9 (29.8)	14.6 (29.2)	2.7 (5.4)	-	32.2 (64.4)
57	14.1 (24.7)	22.0 (38.8)	3.0 (5.3)	-	39.1 (68.6)
67	13.2 (19.7)	27.3 (40.9)	3.3 (4.9)	-	43.8 (65.4)

- a) berechnet über spezifische $^{14}\text{CO}_2$ -Aktivität in der Expirationsluft
 b) ermittelt über die unspezifische ^{14}C -Aktivität im Harn
 c) () = % des Lactat-Kohlenstoff-Transfers
 - = nicht bestimmt

derzufinden. So bewegte sich der in L-Milchsäure wieder-
gefundene Aktivitätsanteil in allen künstlichen Fließ-
gleichgewichten mit ^{14}C -U-D-Milchsäure in einer Größen-
ordnung von 0.8 - 3 % der jeweiligen Gesamt- ^{14}C -Aktivi-
tät im Blut. Er war damit meist nahe an der Nachweisgren-
ze für die spezifische Aktivität von Milchsäure. Eine
spezifische ^{14}C -Aktivität von L-Milchsäure im Harn der
Ziegen ließ sich dagegen nicht eindeutig nachweisen. Die
regelmäßig in geringen Mengen im Harn ausgeschiedene, un-
spezifische ^{14}C -Aktivität (s.Tab. 12 u. 15) muß daher an-
deren, nicht identifizierten Kohlenstoffgerüsten zugeord-
net werden.

4. DISKUSSION

Wie eingangs erörtert, wirft die Bildung von Milchsäure im Vormagen komplexe Probleme auf, insbesondere dann, wenn ein wesentlicher Anteil in Form des D-Isomers vorliegt. Im Pansen bewirkt die Akkumulation von Milchsäure dabei vielfältige Störungen, die unter dem Begriff der Pansenacidose zusammengefaßt werden (DIRKSEN, 1970 a) und zum Teil mit osmotischen Veränderungen und Beeinträchtigungen des Elektrolythaushaltes einhergehen (BOND, 1959; DUNLOP u. HAMMOND, 1965; MACKENZIE, 1967; WALKER, 1968; TELLE u. PRESTON, 1971). Nach der Resorption kann Milchsäure zur metabolischen Acidose führen, wenn durch die vorhandenen Stoffwechsel- und Ausscheidungsmechanismen keine rasche Beseitigung insbesondere des D-Isomers zu erreichen ist (DUNLOP u. HAMMOND, 1965; DIRKSEN, 1970). Hinsichtlich der bis hier aufgezeigten Wirkung von Milchsäure bestehen zwischen D- und L-Isomer keine prinzipiellen Unterschiede. Vielmehr unterscheiden sich beide Isomere darin, daß nur die L-Milchsäure als die physiologische Form rasch metabolisiert werden kann und das D-Isomer damit besonders zur Wirkung kommt.

In der vorliegenden Experimentalarbeit wurden an Ziege, Schaf und Rind quantitative Daten über die Eliminationskinetik von D-Milchsäure aus dem Blut sowie über die Metabolisierung und Ausscheidung dieses Isomers und möglicher Umwandlungsprodukte gewonnen. Größe, Bedeutung und Wechselbeziehungen dieser Mechanismen werden im folgenden diskutiert.

4.1. Kinetisches Verhalten von D-Milchsäure

Bei den kinetischen Untersuchungen wurde davon ausgegangen, daß sich die Summe aller Verteilungs- und Eliminationsvorgänge im Konzentrationsverlauf der D-Milchsäure im Blut ab-

zeichnet. In Übereinstimmung damit zeigte sich nach Abschluß aller Infusionsversuche das vom L-Isomer her bei Rind (DUNLOP u. HAMMOND, 1965) und Ratte (SICHIRI u. Mitarbeiter, 1967) bekannte Bild einer exponentiellen Konzentrationsabnahme.

Die halblogarithmische Transformation des Konzentrationsverlaufes machte die raschen initialen Verteilungsvorgänge in Form eines mehrfach exponentiellen Kurvenverlaufes sichtbar, wie er von anderen Metaboliten wie L-Milchsäure (FORBATH u. Mitarbeiter, 1967; SEARLE u. CAVALIERI, 1972; HUBBARD, 1973) oder Glucose (WHITE u. Mitarbeiter, 1969; WATERHOUSE u. KEILSON, 1969; JUDSON u. LENG, 1972) bekannt ist.

Aus den Daten dieses ersten Kurvenabschnittes ließ sich bei angenommener Gleichverteilung von D-Milchsäure ein Verteilungsraum von 24 - 31 % des Körpergewichtes ermitteln (s. Tab. 4). Diese Größe entspricht einmal recht genau dem Volumen der extrazellulären Flüssigkeit und stimmt zum anderen relativ gut mit dem Verteilungsraum von Glucose bei Wiederkäuern überein, der mit 20 - 30 % des Körpergewichtes angegeben wird (DAVIS u. BROWN, 1962; BERGMAN u. HOGUE, 1967; WHITE u. Mitarbeiter, 1969; JUDSON u. LENG, 1972). Ein Vergleich mit dem Verteilungsraum von L-Lactat liegt nahe, doch sind hier nur Angaben über Nicht-Wiederkäuer bekannt, die zudem beträchtlich variieren. So reichen z. B. beim Menschen die Werte von 49 % (SEARLE u. CAVALIERI, 1972) bis 60 % (KREISBERG u. Mitarbeiter, 1970). Im letzteren Fall entspricht das weitgehend dem Volumen des Gesamtkörperwassers. Demnach dürfte für das L-Isomer ein größerer Verteilungsraum als für das D-Isomer anzusetzen sein. Tatsächlich ergab die Verteilung von D-Milchsäure nach einem vereinfachten 2-Kompartiment-Modell einen deutlich geringeren Eintritt in das extravasale Kompartiment. Auch bei höchsten Belastungen wurden hier, einer Sättigungskurve folgend (vgl. Abb. 7), nur ca. 30 % der Blutkonzentration erreicht. Als Bestätigung für diese un-

gleiche Verteilung sind Untersuchungen am isolierten Rattenzwerchfell (ROOS, 1975) zu sehen. Sie ergaben zwischen umgebendem Medium und Muskelfasern für D-Milchsäure (2.3 - 118 mM) einen Verteilungsquotienten im steady state von innen/außen = 0.35, und bei Konzentrationen unter 2.3 mM Werte von ≤ 0.1 . Für das L-Isomer betrug der Quotient unter identischen Bedingungen 0.4. Als Ursachen werden für D- und L-Milchsäure verschiedenartige "Mechanismen" des Eintritts in die Gewebe diskutiert.

Die Eliminierung von D-Milchsäure aus dem Blut erfolgte nur bei niedrigen Ausgangswerten ($a < 100$ mg/l) mit einer Geschwindigkeit, die dem L-Isomer nahekommt. Eigenen Werten für D-Milchsäure von $T_{1/2} = 25 - 30$ min stehen solche für L-Lactat (DUNLOP u. HAMMOND, 1965) von 22 min gegenüber.

Bei höheren Konzentrationen ergaben sich bei Ziege, Schaf und Rind auffällige Eigentümlichkeiten der Eliminierungskinetik (vgl. Abb. 3 u. 5 und Tab. 5 u. 6). Sie resultierten einmal in mit steigender Konzentration abnehmenden Eliminierungsgeschwindigkeiten, die sich durch maximale Halbwertszeiten von $T_{1/2} = 80$ min (Ziege) bzw. 164 min (Schaf, Rind) kennzeichnen lassen. Zum anderen ergaben sich für bestimmte Konzentrationsbereiche unterschiedliche e - Funktionen, die sich zwar einzeln mathematisch eindeutig beschreiben ließen, aber nicht ohne weiteres hinsichtlich ihres Gesamtverlaufes.

Daß ein derartiger Verlauf der D-Milchsäure-Elimination aus dem Blut nicht auf die eigenen Versuchsbedingungen beschränkt war, ergab sich bei einer nachträglichen Auswertung der Infusionsversuche von DUNLOP u. HAMMOND (1965) mit D-Milchsäure bei Rindern. Der im linearen Maßstab wiedergegebene scheinbar einfach exponentielle Kurvenverlauf ergibt nach semi-logarithmischer Transformation das Bild einer 2-fach zusammengesetzten Eliminationskurve. Ihre näherungsweise ermittelten kinetischen Parameter stimmen ziemlich gut mit den beiden in Tabelle 6 aufgeführten

mittleren Konzentrationsbereichen und ihren Eliminationsdaten überein. Eine weitere Bestätigung dieser Eliminationskinetik ergab sich schließlich in den eigenen Versuchen nach abgesetzter Dauerinfusion (s. Abb. 5).

Besonderes Interesse erwecken im übrigen die deutlichen quantitativen Unterschiede der Eliminationsraten von Ziege gegenüber Schaf und Rind mit Werten von z. B. $k = 0.0087$ bzw. $k = 0.0043$ bei rund 400 - 900 mg D-Milchsäure pro l Blut. Sie lassen sich insofern nicht auf Differenzen der renalen Exkretion zurückführen als auch im Fließgleichgewicht mit identischem Pool und gut übereinstimmenden Exkretionsraten D-Milchsäure von Ziegen eindeutig schneller aus dem Blut eliminiert wurde.

Somit kommt der Metabolisierung von D-Milchsäure für den gesamten Eliminationsprozess entscheidende Bedeutung zu. Sie erscheint einmal verantwortlich für die genannten tierartlichen Differenzen, insbesondere aber auch für die beträchtlichen Unterschiede der Elimination von D- und L-Milchsäure. Für letztere läßt sich neben der bereits zitierten Halbwertszeit von 22 min beim Rind auch ein Wert von $T_{1/2} = 18$ min beim Menschen bei einer Poolgröße von 29 mg/kg G (SEARLE u. CAVALIERI, 1972) anführen. Für D-Milchsäure mit einer Poolgröße von 30 mg/kg wurde beim Schaf dagegen eine Halbwertszeit von 46 min gemessen (vgl. Tab. 8). Der Vergleich von Schaf und Mensch bietet sich hier deshalb an, weil beide nahezu identische Stoffwechselgrößen ($\text{kg}^{0.75}$) besaßen und ELDRIDGE und Mitarbeiter (1974) bei einem Vergleich bekannter Daten demonstrierten, daß bei verschiedenen Species wie Kaninchen, Schaf, Hund, Ratte und Mensch eine identische Beziehung zwischen verschiedenen L-Lactat-Spiegeln im Blut und der jeweiligen Turnoverrate pro kg Stoffwechselgröße besteht.

4.2. Metabolisierung von D-Milchsäure

Die Messungen waren auf eine quantitative Klärung der biochemischen Verhältnisse im D-Lactat-Stoffwechsel gerichtet und wurden deshalb fast ausschließlich in vivo durchgeführt. Dabei konnte von einer nahezu vollständigen Erfassung des aus D-Milchsäure gebildeten CO_2 über die Exhalation ausgegangen werden: Erstens, weil durch den Ructus abgegebenes CO_2 maximal nur 10 % des expirierten ausmacht (McRAE u. Mitarbeiter, 1976), zweitens, weil die Gasbildung im Vormagen der Ziegen infolge des Fastens ohnehin stark herabgesetzt war und drittens, weil der CO_2 -Fluß vom Vormagen in das Blut sich zum umgekehrten Fluß wie 2 : 1 verhält (LENG u. MURRAY, 1972). Auch über den Harn erfolgte ein sehr geringer Abfluß (s. Tab. 15), der im Mittel höchstens 3.4 % des Transfers betrug, wenn man annimmt, daß der "unspezifische" Lactat-C ausschließlich in Form von Hydrogencarbonat, Carbonat und Harnstoff vorlag.

Nach den Ergebnissen, die eine Bilanzierung der metabolischen Flüsse zulassen (s. Tab. 15), wurden maximal rund 80 - 90 % des D-Lactatflusses metabolisiert und davon etwa die Hälfte zu CO_2 oxidiert. Dieses Resultat stimmt recht gut mit der Oxidationsrate von L-Milchsäure überein, die beim Schaf (ANNISON u. Mitarbeiter, 1963) und auch beim Hund (DEPOCAS u. Mitarbeiter, 1969) zu rund 50 % des metabolischen Flusses ermittelt wurden. Entsprechende Messungen beim Menschen weisen mit 11 % (KREISBERG u. Mitarbeiter, 1970) bis 90 % (SEARLE u. CAVALIERI, 1972) eine wesentlich größere Variabilität auf, deren Ursache noch ungeklärt erscheint. Besonders auffällig traten beim D-Isomer die Grenzen des Oxidationsvermögens hervor (vgl. Abb. 13; Tab. 9 u. 10). Zwar erreichte die Oxidationsrate maximal 44 - 45 % des Dosisstromes, fiel aber bei Blutkonzentrationen über 380 mg/l annähernd linear auf 20 % zurück. Da sich auch die absolute Oxidationsrate verminderte, muß eine "Substrathemmung" angenommen werden.

Nach Untersuchungen an Ratten liegt hier ein grundsätzlicher Unterschied zum L-Isomer vor, dessen Zunahme von 90 - 540 mg/l im Blut einen linearen Anstieg der Oxidationsrate verursachte (FREMINET u. Mitarbeiter, 1974), während steigende Dosen von D-Milchsäure den umgekehrten Effekt zur Folge hatten (FABRITIUS, 1974).

Nach Messungen an Gewebeschnitten in vitro dürften insbesondere Herz und Nierenrinde an der Oxidation von D-Milchsäure zu CO_2 beteiligt sein (vgl. Tab. 11), während der relativ geringe Umsatz in Leber und Pansenepithel frühere Ergebnisse bestätigt (HINKSON u. Mitarbeiter, 1967; PRESTON u. NOLLER, 1973). Diese Befunde decken sich nicht mit der Aktivität der D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase, die in Leber und Niere von Lämmern 51 bzw. 41 Einheiten betrug (CAMMACK, 1969). Aber die eigenartigen Beobachtungen einer spontanen pH-abhängigen Aktivierung dieses Enzyms (TUBBS u. GREVILLE, 1961) sowie eines Inaktivierungsfaktors in Kaninchenniere (CAMMACK, 1969) lassen eine weiterreichende Interpretation von in vitro erhaltenen Ergebnissen ohnehin besonders problematisch erscheinen. Immerhin helfen die bisherigen Erkenntnisse über dieses Enzym klären, warum die Oxidation der D-Milchsäure quantitativ anders verläuft als beim L-Isomer, obwohl das primäre Produkt in beiden Fällen Pyruvat ist. Einmal folgt die D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase einer komplizierten Reaktionskinetik, die eine Produkthemmung einschließt und einer Bestimmung der Michaelis-Konstanten bisher im Wege stand (CAMMACK, 1970). Für die vorher erörterte Eliminierungskinetik könnte diese Eigentümlichkeit sogar maßgeblich verantwortlich sein. Zum anderen kann die intramitochondriale Lokalisation des Enzyms die Oxidation der D-Milchsäure in besonderer Weise von Transportfunktionen abhängig machen. Jedenfalls weisen verschiedene Befunde (NEMOTO u. SEVRINGHAUS, 1971; ROOS, 1975) nicht nur auf einen stereospezifischen Transportmechanismus, sondern auch auf eine höhere Affinität

von L-Lactat zum Monocarbonsäure-Carrier hin (OLDENDORF, 1973).

Ein überraschendes Ergebnis der Untersuchungen über die Metabolisierung von D-Milchsäure stellt der starke Übergang in Glucose dar. Frühere Experimente an Ratten (CORI u. CORI, 1929; HOBERMANN u. D'ADAMO, 1960; KOEPPE u. Mitarbeiter, 1964) und Kaninchen (DRURY u. WIDE, 1956) hatten zu der Vorstellung geführt, daß aus D-Milchsäure keine Glucose bzw. kein Glykogen gebildet wird. Nach den eigenen Befunden aus zwei gut übereinstimmenden Versuchen fließen 38 % des Transfers von D-Lactat-C in die Gluconeogenese (vgl. Tab. 14). Damit erreicht diese fast die gleiche Größe wie die Oxidationsrate im Maximum (s. Tab. 15), und es erscheint nicht ausgeschlossen, daß erstere auch bei abnehmender Oxidation auf gleicher Höhe bleibt. Inwieweit Leber und Niere an der Glucosesynthese beteiligt sind, kann aus der in vitro retinierten Aktivität (vgl. Tab. 11) kaum entnommen werden und muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Hinsichtlich des metabolischen Weges muß wohl eine Racemisierung zu L-Lactat außer Betracht bleiben, wenn man von dem geringen Aktivitätsanteil ausgeht (vgl. Tab. 13), der diesem Isomer bei Verabreichung von ^{14}C -U-D-Milchsäure zufiel. Obgleich schon auf die Existenz einer Lactatracemase hingewiesen wurde (HUENNEKENS u. Mitarbeiter, 1951), schließen die eigenen Befunde diese weitgehend aus. Sie legen vielmehr nahe, daß die Aktivität im L-Lactat durch Recycling über Glucose hineingelangt.

4.3. Ausscheidung von D-Milchsäure

Was die Ausscheidung von Milchsäure und insbesondere von D-Lactat betrifft, so sind Daten von Wiederkäuern und monogastrischen Tierarten ausgesprochen rar und scheinbar recht widersprüchlich. Während z.B. CORI und CORI (1929) und MEDZIHRADSKY und LAMPRECHT (1966) übereinstimmend zu

dem Ergebnis kamen, daß bei Ratten bereits 3 Stunden nach oraler Aufnahme von D-Milchsäure 29 bzw. 23 % wieder im Harn erscheinen, konnte FABRITIUS (1974) auch nach intra-peritonealer Applikation im Mittel nur 3.3 %, bei einem Maximum von 8 % der Dosis im 6-Stunden-Harn wiederfinden. Ebenso wurde auch bei Versuchen mit Schafen einerseits bei erhöhten Gesamtmilchsäure-Spiegeln im Harn eine beträchtliche Ausscheidung von D-Milchsäure in Betracht gezogen (WHANGER u. MATRONE, 1966; HUBER, 1969; TELLE u. PRESTON, 1971), ohne daß eine Differenzierung der beiden Isomeren erfolgte. Andererseits fand BARTELMUS (1975) bei erhöhter DL-Milchsäure-Konzentration im Pansen keine bzw. nur eine unbedeutende (< 0.1 mM) Exkretion von D-Milchsäure.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist die Exkretion von Milchsäure über den Harn und insbesondere des D-Isomers ein rascher und wirksamer Mechanismus (vgl. Abb. 11). So sind bei rascher intravenöser D-Milchsäure-Anflutung die 6-Stunden-Ausscheidungen für Ziege, Schaf und Rind gleichermaßen linear mit der Dosis korreliert. Bei Bezug der D-Milchsäure-Dosis auf die Stoffwechselgröße treten selbst dann keine quantitativen Ausscheidungsunterschiede hervor, wenn man Befunde von der Ratte (FABRITIUS, 1974) mit denen von Wiederkäuern vergleicht. Zudem scheint das D-Isomer ebenso wie das L-Isomer für die Niere des Wiederkäuers ein Schwellenstoff zu sein, der bis zu einem Blutspiegel von 163 mg/l vollständig rückresorbiert wird (s. Abb. 12). Mit einer D-Lactat-Ausscheidung beim Wiederkäuer ist demnach nur dann zu rechnen, wenn diese Konzentration im Blut überschritten wird. Für einen tierartlichen Vergleich stehen nur Daten vom Schwein zur Verfügung. Hier lag nach Angaben von LINDENA (1975) die Nierenschwelle von drei Tieren mit 18 bzw. 90 mg/l deutlich niedriger. Der entsprechende Wert für L-Milchsäure - bei den eigenen Untersuchungen wurde er nicht bestimmt - scheint höher zu liegen: Beim Menschen 126 - 630 (MILLER u. MILLER, 1949;

MAN u. Mitarbeiter, 1969; GORDON, 1973), beim Hund 450 - 900 (CRAIG, 1946; LEVY, 1962; DIES u. Mitarbeiter, 1969) und beim Schwein 360 - 540 mg/l (LINDENA, 1975). Als Ursache dieser unterschiedlichen Kapazität zur Rückresorption von D- und L-Milchsäure in der Niere könnten einerseits stereospezifische Transportmechanismen mit unterschiedlicher Affinität in Frage kommen, wie sie bereits an der Blut-Hirn-Schranke gefunden wurden (NEMOTO u. SEVRINGHAUS, 1971; OLDENDORF, 1973). Andererseits wurde von HÖHMANN u. Mitarbeiter (1974) gezeigt, daß bei Ratten die Rückresorption von L-Lactat keinen Carrier erfordert, sondern durch einfache Diffusion entlang einem Konzentrationsgradienten erfolgt, der durch dauernde intracelluläre Milchsäure-Utilisation aufrecht erhalten bleibt. Sollte die Gluconeogenese in der Nierenrinde der Wiederkäuer aus D-Lactat geringer sein als aus L-Lactat, könnte dieser Zusammenhang als Ursache für die geringere Nierenschwelle des D-Isomers angesehen werden.

4.4 Allgemeine Folgerungen

Die vorgelegten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß bei Eintritt von D-Milchsäure in die Zirkulation die biochemische Umwandlung und die renale Exkretion als Mechanismen der Eliminierung wirksam werden. Ihre funktionellen Grenzen kennzeichnen die Belastbarkeit des Organismus. Während die Metabolisierungsprozesse bei steigendem Substratzufluß bald einen Maximalwert erreichen und sich danach verlangsamen, nimmt die renale Exkretion ohne erkennbare Grenze zu. Trotzdem ist dieser Mechanismus limitiert, wenn bei Pansenacidose hypertonische Verhältnisse die Harnbildung einschränken. Dann muß die Eliminierung von D-Milchsäure maßgeblich von den biochemischen Umwandlungsreaktionen bestimmt werden.

Ihre obere Begrenzung läßt sich aus den Infusionsversuchen mit Ziegen wie folgt ableiten: Bei maximalen Raten der Oxidation und der Gluconeogenese können in 24 h höchstens 1.5 g D-Milchsäure pro kg G metabolisiert werden. Der Bildung von Glucose aus D-Milchsäure kommt unter den gegebenen Bedingungen außer der Beseitigung von D-Lactat wohl keine große Bedeutung zu. Geht man davon aus, daß die vorgenannte Menge D-Milchsäure in einer homolactischen Gärung im Pansen unter Bildung einer gleichen Menge L-Isomer entstanden ist, so würde sich die hierfür umgesetzte Menge an leicht verdaulichen Kohlenhydraten auf rund 90 g / 24 h belaufen. Selbst am Erhaltungsbedarf gemessen - 300 g verdauliche organische Substanz pro Tag (LINDAHL, 1972) - erscheint diese Menge sehr gering. Demnach bedarf es zur Entstehung der D-Milchsäure-Acidose keiner mengenmäßigen Überfütterung, sondern es genügt eine stärkereiche "Normalration" wie auch experimentell bereits dargetan wurde (GIESECKE u. Mitarb., 1976).

Die begrenzte Kapazität zur Metabolisierung von D-Milchsäure wird als Grund dafür angesehen, daß eine Verhinderung der D-Milchsäure-Produktion durch frühzeitige Adaptation der Pansenflora die sicherste Möglichkeit zur Vermeidung einer D-Milchsäure-Acidose bietet. Um die Kapazität zur biochemischen Umwandlung von D-Milchsäure zu verbessern, kann in Hinblick auf die mögliche Produkthemmung durch Pyruvat (CAMMACK, 1970) eine Substitution von Cofaktoren in Betracht gezogen werden. In diesbezüglichen Versuchen an Schafen (HUBER, 1960) wurde zwar durch Thiamingaben die Halbwertszeit von DL-Lactat - 65 bis 127 min - nicht herabgesetzt. Die hier aufgezeigten neuen experimentellen Möglichkeiten einer differenzierten quantitativen Ermittlung der Oxidationsrate von D-Milchsäure, der Befund einer zunehmenden Hemmung der D-Milchsäure-Oxidation bei steigendem Substratfluß und Hinweise auf eine bessere Wirksamkeit von Thiaminpyrophosphat unter acidotischen Stoffwech-

selbedingungen (MARKEES, 1966) lassen eine gründliche Untersuchung der therapeutischen Beeinflußbarkeit der D-Milchsäure-Oxidation interessant erscheinen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Um bei Wiederkäuern das metabolische Schicksal von D-Milchsäure quantitativ zu beschreiben, wurden an 4 Ziegen, 3 Schafen und 1 Rind nach intravenöser Infusion von DL-Milchsäure die Stoffwechselkinetik des D(-)Isomers und seine renale Ausscheidung untersucht, sowie die Metabolisierung des ^{14}C -markierten Isomers zu CO_2 , Glucose und anderen Verbindungen in vivo (Ziegen) und die relative Beteiligung einzelner Organe (Schaflämmer) an der Oxidation mit Hilfe von Gewebeschnitten in vitro gemessen. Dabei ließen sich folgende Ergebnisse erzielen:

1. Das Verteilungsvolumen von D-Milchsäure entspricht mit 24 - 31 % des Körpergewichtes der Größe des Extracellulärtraumes. Die Verteilung zwischen extra- und intravasalem Kompartiment erreichte maximal (Konzentration im Blut 1370 mg/l) einen Quotienten von 0.32.
2. Die Elimination von D-Milchsäure folgte einer komplexen, konzentrationsabhängigen Kinetik mit maximal 4 hintereinanderliegenden Exponentialfunktionen. Die Halbwertszeit stieg von 25 - 30 min bei ≤ 100 mg/l tierartlich verschieden bis auf 80 min (Ziege) bzw. 164 min (Rind, Schaf) bei 900 mg/l.
3. Die Exkretion von Milchsäure im Harn stieg linear mit der verabreichten Dosis, beim D-Isomer rund 3.5 mal schneller als beim L-Isomer. Die Nierenschwelle für D-Lactat wurde bei Ziege und Schaf zu 163 mg/l ermittelt. Im künstlichen Fließgleichgewicht (Ziegen) von 0.84 - 2.0 mg/kg·min wurden im Harn 14 - 41 % des Dosisstromes als D-Lactat und 1.8-5.4 % in anderer Form ausgeschieden.

4. Die Oxidationsrate von D-Milchsäure zu CO_2 erreichte bei einer Blutkonzentration von 240 - 343 mg/l einen Maximalwert von 0.63 mg/kg $\cdot$ min (45 % des Dosisstromes). Bei höheren Flüssen wurde die Oxidation gehemmt und die Rate fiel auf 20 % zurück. In Gewebeschnitten von Herzmuskel und Nierenrinde erfolgte die Oxidation von D-Lactat zu CO_2 rund 20 mal schneller als in Leber und Pansenepithel.

5. Im künstlichen Fließgleichgewicht mit 360 mg D-Milchsäure pro l Blut wurden 38 % des D-Lactats in Glucose transformiert. Das entsprach einem Anteil von 13 % des metabolischen Glucoseflusses. Einer Racemisierung von D- in L-Milchsäure kommt keine Bedeutung zu.

Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf biochemische Besonderheiten des D-Isomers diskutiert und allgemeine Schlußfolgerungen bezüglich der metabolischen D-Milchsäure-Acidose gezogen.

SUMMARY

In order to quantify the metabolic fate of D-lactic acid in ruminants the metabolic kinetics and renal excretion were investigated in 4 goats, 3 sheep and 1 cow after intravenous infusions of DL-lactate. The metabolism of the ^{14}C -labelled isomer to CO_2 , glucose and other compounds was measured in vivo (goats) and the relative contributions of certain organs (lambs) to the oxidation of D-lactate to CO_2 in vitro using tissue slices. The following results were obtained:

1. The space of D-lactate accounted for 24 - 31 % of bodyweight and equaled the size of the extracellular space. The distribution between extra- and intravascular compartments peaked at 0.32 with a blood concentration of 1370 mg/l.
2. The elimination of D-lactic acid followed a concentration dependent complex kinetic with a maximum of 4 serial exponential functions. The half-life of 25 - 30 min at ≤ 100 mg/l increased with species differences to 80 min (goat) and 164 min (sheep, cow) at 900 mg/l.
3. The excretion of lactic acid in urine increased linear with dosage, with the D-isomer about 3.5 times faster than with the L-isomer. The kidney threshold for D-lactate in goat and sheep accounted for 163 mg/l. During steady state infusion in goats of 0.84-2.0 mg/kg.min 14 - 41 % of the dosage were excreted in urine as D-lactate and 1.8 - 5.4 % in other forms.
4. The oxidation rate of D-lactate approached a maximum of 0.63 mg/kg.min (45 % of transfer) at blood levels of 240 - 343 mg/l. At higher flow rates the oxidation was

inhibited and decreased to 20 % of transfer. In tissue sclices of heart muscle and kidney cortex the oxidation of D-lactate to CO_2 was about 20 times faster than in those of liver and rumen epethilium.

5. In steady state blood level of 360 mg/l D-lactic acid 38 % of this isomer were transformed into glucose. This accounted to 13 % of metabolic glucose flow. Racemization of D- to L-lactic acid is not important.

The results are discussed with regard to biochemical peculiarities of D-lactate and general conclusions are drawn with regard to metabolic D(-)lactic acidosis.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ANNISON, E.F., D.B. LINDSAY u. R.R. WHITE, 1963
Metabolic interrelationship of glucose and lactate in sheep.
Biochem. J. 88, 243
- ANNISON, E.F. u. J.L. LINZELL, 1964
The oxidation and utilization of glucose and acetate by the mammary gland of the goat in relation to their overall metabolism and to milk production.
J. Physiol. 175, 372
- ANNISON, E.F., 1965
Absorption from the ruminant stomach.
In R.W. DOUGHERTY:
Physiology of digestion in the ruminant, S.185
Butterworth, London
- ALIZADE, A. u. H. SIMON, 1973
Zum Mechanismus und zur Kompartimentierung der L- und D-Lactat-Bildung aus L-Malat bzw. D-Glucose in *Leuconostoc mesenteroides*.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 163
- BARTELMUS, C., 1975
Untersuchungen über das Verhältnis der Milchsäure-Isomeren im Pansen und ihre Ausscheidung im Harn.
Vet. Med. Diss., München
- BERGMANN, E.N. u. D.E. HOGUE, 1967
Glucose turnover and oxidation rates in lactating sheep.
Am. J. Physiol. 213, 1378
- BERGMEYER, H.U. u. H. BERNT, 1962
Bestimmung mit Glucose-Oxydase und Peroxydase, S.1172
In H.U. BERGMEYER:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

BOND, H.E., 1959

A study on the pathogenesis of acute indigestion in sheep.

Ph. D. Thesis, Cornell Univ., Ithaca

BRAIDE, B.C. u. R.H. DUNLOP, 1969

Pharmacologic differences between sodium D-lactate and sodium L-lactate in sheep.

Am. J. Vet. Res. 30, 1281

BRAY, G.A., 1960

A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in liquid scintillation counter.

Anal. Biochem. 1, 279

BRÜGGEMANN, J. u. D. GIESECKE, 1968

Milchsäuregehalt im Pansen und mikrobieller Abbau in vitro.

Zbl. Vet. Med. 15, 470

CAMMACK, R., 1968

Spontaneous activation of D-2-hydroxy acid dehydrogenase of rabbit kidney.

Biochem. J. 109, 46

CAMMACK, R., 1969

Assay, purification and properties of mammalian D-2-hydroxy acid dehydrogenase.

Biochem. J. 115, 55

CAMMACK, R., 1970

Mammalian D-2-hydroxy acid dehydrogenase. Effect of inhibitors and reaction sequence.

Biochem. J. 118, 405

CORI, C.F. u. G.T. CORI, 1929

Glycogen formation in the liver from d- and l-lactic acid.

J. Biol. Chem. 81, 389

CRAIG, F.N., 1946

Renal tubular reabsorption, metabolic utilisation and isomeric fractionation of lactic acid in the dog.

Am. J. Physiol. 146, 146

C.S.I.R.O., Australia, 1949 - 1959

Toxicity of large rations of wheat.

Ann. Repts. 1 - 11

DAGLEY, S. u. D.E. NICHOLSON, 1970

An introduction to metabolic pathways.

Spottiswood, Ballantyne & Co Ltd, London

DAKIN, H.D. u. H.W. DUDLEY, 1913

On glyoxalase.

J. Biol. Chem. 14, 423

DAVIS, C.L. u. R.E. BROWN, 1962

Availability and metabolism of various substrates in ruminants. IV. Glucose metabolism in the young calf and growing steer.

J. Dairy Sci. 45, 513

DEPOCAS, F., Y. MINAIRE u. J. CHATTONET, 1969

Rates of formation and oxidation of lactic acid in dogs at rest and during moderate exercise.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 47, 603

DIES, F., G. RAMOS, E. ALVELAR u. M. LENNIHOFF, 1969

Renal excretion of lactic acid in the dog.

Am. J. Physiol. 216, 106

DIRKSEN, G., 1965

Über die Pansenacidose des Rindes.

Vet. Med. Nachr. 2, 70

DIRKSEN, G., 1970

Acidosis.

In A.T. PHILLIPSON:

Physiology of digestion and metabolism in the ruminant, S.612

Oriel Press, Newcastle

DIRKSEN, G., 1970 a

Krankheiten des Verdauungsapparates.

In G. ROSENBERGER:

Krankheiten des Rindes, S.173

Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg

DIRKSEN, G., 1973

Mikroorganismen und Störungen der Pansenfunktion.

In D. GIESECKE u. H.K. HENDERICKX:

Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung, S.256

BLV Verlagsgesellschaft, München-Bern-Wien, 1973

DOBSON, A., 1961

Absorption from the rumen.

In D. LEWIS:

Digestive physiology and nutrition of the ruminant, S.68

Butterworth Scientific Publication, London

DOCUMENTA GEIGY, 1968

Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage

Redaktion : K. Diem u. C. Leutner

Herausgeber: J.R. Geigy AG, Pharma, Basel

DOST, F.H., 1968

Grundlagen der Pharmakokinetik.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

DRURY, D.R. u. A.N. WICK, 1956

Metabolism of lactic acid in the intact rabbit.

Am. J. Physiol. 184, 304

DUNLOP, R.H., P.B. HAMMOND u. C.E. STEVENS, 1964

D-lactate in bovine blood following carbohydrate engorgement.

Fed. Proc. 23, 262

DUNLOP, R.H. u. P.B. HAMMOND, 1965

D-lactic acidosis of ruminants.

Ann. New York Acad. Sci. 119, 1109

- ELDRIDGE, F.L., L. T'SO u. H. CHANG, 1974
Relationship between turnover rate and blood
concentration of lactate in normal dogs.
J. appl. Physiol. 37, 316
- ELLIOTT, K.A.C., 1955
Tissue sclice technique.
Methods in Enzymology:
Vol.I, Acad.Press inc., Publishers, New York
- ELLIOT, W.H., 1959
Aminoacetone: its isolation and role in
metabolism.
Nature, Lond. 183, 1051
- ELSDEN, S.R., B.E. VOLCANI, F.M.C. GILCHRIST u.
D. LEWIS, 1956
Properties of fatty acids forming organism
isolated from the rumen of sheep.
J. Bacteriol. 72, 681
- FABRITIUS, A., 1974
Die Metabolisierung und Ausscheidung von
D(-)Milchsäure - Versuche an Ratten mit
spezifischen biochemischen Methoden.
Vet. Med. Diss., München
- FORBATH, N., A.B. KENSHOLE u. G. HETENYI jr., 1967
Turnover of lactic acid in normal and dia-
betic dogs calculated by two tracer methods.
Am. J. Physiol. 212, 1179
- FREMINET, A., E. BURSAUX u. C.F. POYART, 1974
Effect of elevated lactataemia on the rates
of lactate turnover and oxidation in rats.
Pflügers Arch. 346, 75
- FUJIHARA, T., T. FURNHASHI u. J. TASAKI, 1973
Tracheal fistula technique for goats.
J. Dairy Sci. 56, 820

- GAWEHN, K. u. H.U. BERGMAYER, 1971
D-Lactat, S.1450
In H.U. BERGMAYER:
Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Auflage, Band II
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- GIESECKE, D., 1968
Über die Eliminierung von Milchsäure aus
dem Pansen.
Zbl. Vet. Med. A 15, 656
- GIESECKE, D., 1973
Biologie und Biochemie der Bakterien im Pansen.
In D. GIESECKE u. H.K. HENDERICKX:
Biologie und Biochemie der mikrobiellen
Verdauung, S.9
BLV Verlagsgesellschaft, München-Bern-Wien
- GIESECKE, D. u. A. FABRITIUS, 1974
Oxidation and excretion of D-lactic acid
by rats.
Experientia 30, 1124
- GIESECKE, D., C. BARTELMUS u. M. STANGASSINGER, 1976
Untersuchungen zur Genese und Biochemie der
Pansenacidose.
3. Stoffwechseldynamik von D(-)- und L(+)-
Milchsäure nach Verabreichung von Zuckern
und nach Überfütterung mit Stärke.
Zbl. Vet. Med. A 23, 353
- GORDON, E.E., 1973
Etiology of lactic acidosis.
Am. J. Med. Sci. 265, 463
- HARMEYER, J., 1973
Protozoologie des Pansens.
In D. GIESECKE u. H.K. HENDERICKX:
Biologie und Biochemie der mikrobiellen
Verdauung, S.58
BLV Verlagsgesellschaft, München-Bern-Wien

- HARMEYER, J., J. VARADY u. R. BIRCK, 1973
Kinetische Parameter des Harnstoff-Stoff-
wechsels kleiner Wiederkäuer bei Fütterung
und bei Hunger.
Arch. Tierernährung 23, 461
- HOBERMANN, H.D. u. A.F. D'ADAMO jr., 1960
Coupling of oxidation of substrates to re-
ductive biosynthesis.
III. L- and D-lactates.
J. biol. Chem. 235, 514
- HOBSON, P.N. u. S.O. MANN, 1961
The isolation of glycerol-fermenting and
lipolytic bacteria from the rumen of the
sheep.
J. gen. Microbiol. 25, 227
- HÖHMANN, B.H., P.P. FROHNERT, R. KINNE u. K.
BAUMANN, 1974
Proximal tubular lactate transport in rat
kidney: A micropuncture study.
Kidney International 5, 261
- HOHORST, H.J., K. GAWEHN u. H.U. BERGMAYER, 1970
L-Lactat: Bestimmung mit LDH und NAD, S.1425
In H.U. BERGMAYER:
Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Auflage, Band II
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- HOLTEN, C.H., 1971
Lactic acid.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- HOPGOOD, M.F. u. D.J. WALKER, 1967
Succinic acid production by rumen bacteria.
I. Isolation and metabolism of ruminococcus
flavefaciens.
Aust. J. biol. Sci. 20, 165
- HUBBARD, J.L., 1973
The effect of exercise on lactate metabolism.
J. Physiol. 231, 1

HUBER, T.L., 1969

Effect of ration on liver oxidation of racemic lactate and of thiamine on blood lactate clearance.

J. Anim. Sci. 28, 98

HUENNEKENS, F.M., H.R. MAHLER u. J. NORDMANN, 1951

Studies on the cyclophorase system.

XVII. Occurrence and properties of alpha-hydroxy acid racemase.

Arch. Biochem. 30, 77

HUETER, F.G., J.C. SHAW u. R.N. DOETSCH, 1956

Absorption and dissimilation of lactates added to the bovine rumen and the resulting effects on blood glucose.

J. Dairy Sci. 39, 1430

HUNGATE, R.E., 1966

The rumen and its microbes.

Academic Press, New York-London

HYLDGAARD-JENSEN, G. u. H. SIMESSEN, 1966

Grutforgifting hos Kvaeg.

Nordish Vet. Med. 18, 71

JOHNS, A.T., 1949

Mechanism of propionic formation in bacterial fermentation.

Nature, 164, 620

JOHNS, A.T., 1951

The mechanism of propionic acid formation by *Veillonella gazogenes*.

J. gen. Microbiol. 5, 326

JOYNER, A.E. u. R.L. BALDWIN, 1966

Enzymatic studies of pure cultures of rumen microorganisms.

J. Bacteriol. 92, 1321

JUDGE, M.A. u. J. VAN EYS, 1962

Excretion of D-lactic acid by humans.

J. Nutr. 76, 310

JUDSON, G.J. u. R.A. LENG, 1972

Estimation of the total entry rate and re-synthesis of glucose in sheep using glucose uniformly labelled with ^3H .

Aust. J. biol. Sci. 25, 1313

KOEPPE, R.E., N.F. INCIARDI, L.G. WARNOCK u. W.E.

WILSON, 1964

Some aspects of the metabolism of D- and L-lactic acid-2- ^{14}C by rat skeletal muscle in vivo.

J. Biol. Chem. 239, 3609

KREISBERG, R.A., J.F. PENNINGTON u. C.R. BASHELL, 1970

Lactate turnover and gluconeogenesis in normal and obese humans. Effect of starvation.

Diabetes 19, 53

KROGH, N., 1961

Studies on alterations in the rumen fluid of sheep, especially concerning the microbial composition, when readily available carbohydrates are added to the food.
IV. Identification of the gram-positive flora developing during the feeding experiments.

Acta vet. scand 2, 357

KROGH, N., 1963

Identification of the gram-positive rumen flora of cattle and sheep on clinical cases of acute indigestion.

Acta vet. scand. 4, 27

KRONFELD, D.S. u. M.G. SIMESSEN, 1961

Glucose biokinetics in sheep.

Am. J. Physiol. 201, 639

LANDES, C., 1975

Untersuchungen über den renalen Aminosäuretransport beim Lamm.

Vet. Med. Diss., München

- LEAL-PINTO, E., H.C. PARK, F. KING, M. MACLEOD
u. R.F. PITTER, 1973
Metabolism of lactate by the intact
functioning kidney of the dog.
Am. J. Physiol. 224, 1463
- LENG, R.A., J.W. STEEL u. J.R. LUICK, 1967
Contribution of propionate to glucose
synthesis in sheep.
Biochem. J. 103, 785
- LENG, R.A. u. R.M. MURRAY, 1972
Estimation of the fermentation rate in the
rumen of sheep using VFA production, carbon
dioxide production and methane production.
In: Tracer studies on non-protein nitrogen
for ruminants.
International Atomic Energy Agency, Vienna, 1972
- LEVY, M.N., 1962
Uptake of lactate and pyruvate by intact
kidney of the dog.
Am. J. Physiol. 202, 302
- LINDAHL, I.L., 1972
Nutrition and feeding of goats.
In D.C. CHURCH:
Digestive physiology and nutrition of
ruminants.
Practical Nutrition 3, 261
- LINDENA, J., 1975
Untersuchungen zur Kinetik des Lactat-
stoffwechsels beim Hausschwein.
Vet. Med. Diss., Hannover
- LUICK, J.R., S.J. PERSON, R.D. CAMERON u. R.G. WHITE, 1973
Seasonal variations in glucose metabolism of
reindeer (*Rangifer tarandus* L.) estimated
with (U-¹⁴C)glucose and (3-³H)glucose.
Brit. J. Nutr. 29, 245

- MAC RAE, J.S., S. WILSON u. J.A. MILNE, 1976
Carbon metabolism in sheep fed on poor
quality hill herbage.
Proc. Nutr. Soc. 35, 103 A
- MACKENZIE, D.D.S., 1967
Production and utilization of lactic acid
by the ruminant. A review.
J. Dairy Sci. 50, 1772
- MAHLER, H.R., A. TOMISEK u. F.M. HUENNEKENS, 1953
Studies on the cyclopherase system.
XXVI. Lactic oxidase.
Exptl. Cell. Res. 4, 208
- MAN, N.K., P. KELLER, W. HALLAUER u. J. SCHIERMEISTER, 1969
Über den Mechanismus der renalen Lactat-
bearbeitung beim Menschen.
Klin. Wschr. 47, 1170
- MANN, Th., 1975
Über die vergleichende Biochemie von Sperma-
tozoen.
Gastvorlesung im F. B. Tiermedizin d. Univ.
München. 16. 5. 1975
- MARKEES, S., 1966
Carboxylase bei diabetischer Acidose -
Experiment und Klinik.
In H. Frhr. von KRESS, K.U. BLUM:
B-Vitamine, S.171
F.K. Schattauer, Stuttgart
- MEDZIHRADSKY, F. u. W. LAMPRECHT, 1966
Stoffwechseluntersuchungen mit Essig-,
Milch- und Citronensäure.
Z. Lebensmittelunters. u. Forsch. 130, 171
- MEYERHOF, O. u. L. LOHMANN, 1926
On respiration and carbohydrate utilization
of animal tissue.
Biochem. Z. 171, 421

- MILLER, A.T. jr. u. J.O. MILLER jr., 1949
Renal excretion of lactic acid in exercise.
J. Appl. Physiol. 1, 614
- NEMOTO, E.M. u. J.W. SEVRINGHAUS, 1971
The stereospecific influx permeability of
rat blood-brain barrier (BBB) to lactic
acid (LA).
Abstract.
Clin. Res. 19, 146
- NEUBERG, C., 1913
Weitere Untersuchungen über die biochemische
Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure
nebst Bemerkungen über die Entstehung der
verschiedenen Milchsäuren in der Natur.
Biochem. Z. 51, 484
- NIETH, H., P. SCHOLLMAYER, 1966
Substrate utilisation of the human kidney.
Nature 209, 1244
- OGIMOTO, K. u. D. GIESECKE, 1974
Untersuchungen zur Genese und Biochemie
der Pansenacidose.
2. Mikroorganismen und Umsetzung von Milch-
säure-Isomeren.
Zbl. Vet. Med. A 21, 532
- OLDENDORF, W.H., 1973
Carrier-mediated blood-brain barrier trans-
port of short-chain monocarboxylic organic
acids.
Am. J. Physiol. 224, 1450
- ORTH, A. u. W. KAUFMANN, 1961
Die Verdauung im Pansen und ihre Bedeutung
für die Fütterung der Wiederkäuer.
Verlag Paul Parey, Hamburg-Berlin
- PHILLIPSON, A.T., 1952
The fatty acids present in the rumen of
lambs fed on a flaked maize ration.
Brit. J. Nutr. 6, 190

PRESTON, A.M. u. C.H. NOLLER, 1973

Metabolism of D-lactate by tissues of the ruminant digestive tract.

J. Anim. Sci. 37, 1403

PRINS, R.A., 1976

The significance of lactate isomers as intermediates in the rumen fermentation.

Vortrag: 3rd International conference on production disease in farm animals.

Wageningen, The Netherlands, 13.-16. Sept. 1976

RESCIGNO, A. u. G. SEGRE, 1966

Drug and tracer kinetics.

Blaisdell, Waltham, Mass.

ROBERTSON, J.S., 1957

Theory and use of tracers in determining transfer rates in biological systems.

Physiol. Rev. 37, 133

ROOS, A., 1975

Intracellular pH and distribution of weak acids across cell membranes. A study of D- and L-lactate and of DMO in rat diaphragm.

J. Physiol. 249, 1

SACHS, L., 1972

Statistische Auswertungsmethoden.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

SATTER, L.D. u. W.J. ESDALE, 1967

In vitro lactate metabolism by ruminal ingesta.

Appl. Microbiol. 16, 680

SCHAADT, H. u. R.R. JOHNSON, 1969

Effect of maturity, fermentation time, and limestone and urea treatment on D(-)- and L(+)lactic acid in corn silage.

J. Dairy Sci. 51, 802

- SCHMIDT, S.P., J.A. SMITH u. J.W. YOUNG, 1975
Rapid determination of (carbon-14)glucose
specific radioactivity for in vivo glucose.
J. Dairy Sci. 58, 952
- SCHWARTZ, H.M. u. F.M.C. GILCHRIST, 1975
Microbial interactions with the diet and
the host animal.
In I.W. McDONALD u. A.C. WARNER, 1975
Digestion and metabolism in the ruminant,
S.165
Proceedings of the IV. Int. Symposium on
Ruminant Physiology.
Sydney, Australia, August 1974
- SEARLE, G.L. u. R.R. CAVALIERI, 1972
Determination of lactate kinetics in the
human analysis of data from single injec-
tions vs. continuous infusion methods.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 1002
- SHICHIRI, M., M. MILLER u. H. WOODWARD jr., 1967
Disappearance of DL-lactate-2-¹⁴C from blood
in normal and diabetic rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 125, 1238
- SHIPLEY, R.A. u. R.E. CLARK, 1972
Tracer methods for in vivo kinetics.
Theory and applications.
Academic Press, New York-London
- SKINNER, S.M., R.E. CLARK, N. BAKER u. R.A.
SHIPLEY, 1959
Complete solution of the three-compartment
modell in steady state after single injection
of radioactive tracer.
Am. J. Physiol. 196, 238
- SLYTER, L.L., J. BOND, T.S. RUMSEY u. J.M. WEAVER, 1974
Ruminal bacteria, lactic acid and glucose
in heifers after fasting and refeeding.
J. Anim. Sci. 41, 252 Abstr.

SOLOMON, A.K., 1953

The kinetics of biological processes.
Special problems connected with the use
of tracers.

Advances in Biol. a. Med. Phys. 3, 65

SOMOGYI, M.J. 1945

The determination of blood sugar.

J. Biol. Chem. 160, 69

STEELE, R., J.S. WALL, R.C. DE BODO u. N. ALTZULER, 1966

Measurement of seize and turnover rate of body
glucose pool by the isotope dilution method.

Am. J. Physiol. 211, 15

STETTER, K.O. u. O. KANDLER, 1973

Untersuchungen zur Entstehung von DL-Milch-
säure bei Lactobacillen und Charakterisierung
einer Milchsäure-Racemase bei einigen Arten
der Untergattung Streptobacterium.

Arch. Mikrobiol. 94, 221

TELLE, P.P. u. R.L. PRESTON, 1971

Ovine lactic acidosis: intraruminal and
systemic.

J. Anim. Sci. 33, 698

TUBBS, P.K. u. G.D. GREVILLE, 1961

The oxidation of D- α -hydroxy acids in
animal tissues.

Biochem. J. 81, 104

TUBBS, P.K., 1965

The metabolism of D- α -hydroxy acids in
animal Tissues.

Ann. N.Y. Acad. Sci 119, 920

WALDO, D.R. u. L.H. SCHULTZ, 1956

Lactic acid production in the rumen.

J. Dairy Sci. 39, 1453

WATERHOUSE, Ch. u. J. KEILSON, 1969

CORI cycle activity in man.

J. clin. Invest. 48, 2359

- WHANGER, P.D. u. G. MATRONE, 1966
Effect of dietary sulfur upon the production and absorption of lactate in sheep.
Biochim. Biophys. Acta 124, 273
- WHITE, R.G., J.W. STEEL, R.A. LENG u. J.R. LUICK, 1969
Evaluation of three isotope-dilution techniques for studying the kinetics of glucose metabolism in sheep.
Biochem. J. 114, 203
- WILLIAMS, V.J. u. D.D.S. MACKENZIE, 1965
The absorption of lactic acid from the reticulorumen of the sheep.
Aust. J. Biol. Sci. 18, 917
- WOODS, H.F. u. H. KREBS, 1971
Lactate production in the perfused rat liver.
Biochem. J. 125, 129
- ZILVERSMIT, D.B., 1960
The design and analysis of isotope experiments.
Am. J. Med. 29, 832

Der Leitung des Institutes gilt mein Dank
für die gewährten Arbeitsmöglichkeiten.

Besonders danken möchte ich Herrn Professor
Dr. Dieter Giesecke für die Überlassung des
Themas und die jederzeit gewährte Unter-
stützung und wissenschaftliche Anregung für
das Gelingen dieser Arbeit.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch
Herrn Professor Dr. G. Dirksen für die Mög-
lichkeit, Tierversuche in der II. Medizini-
schen Tierklinik mit Unterstützung durch das
Klinikpersonal durchführen zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei Frl. Dr. R.
Günzel für die wertvolle Unterstützung bei
operativen Versuchsvorbereitungen sowie bei
Frau S. Wiesmayr für ihr entgegenkommendes
Interesse bei technischen Problemen bedanken.

LEBENS LAUF

Manfred Stangassinger	geb. am 5. Juni 1948 in München
Eltern	Johann Stangassinger, Metzgermeister Barbara Stangassinger, geb. Sedlmeier
Familienstand	verheiratet seit 2. Juni 1972 mit Renate Stangassinger, geb. Krula, Studienrätin für Sport und Chemie
Schulausbildung	von 1954 - 1958 an der Pestalozzischule in München von 1958 - 1966 am Oskar-von-Miller Gymnasium in München von 1966 - 1967 am Privaten Gymnasium Dr. Merz in München 1967 Reifeprüfung am math. nat. Gymnasium Fürstenfeldbruck
Universitätsausbildung	von 1967 - 1972 Studium der Veterinärmedizin an der Universität München 1973 Staatsexamen und Approbation als Tierarzt
gegenwärtige Tätigkeit	seit März 1975 Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie u. Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin der Universität München

